生命奥秘
LifeOmics

2015年 12月刊 总第81期

血友病

- 肠道菌群与大脑发育
- 章鱼：美在简单

无奇不有
生命世界

做读生命
走进科学

目录 CONTENTS

专 题 血友病

前言 01

一、遗传性疾病——血友病简介 02

二、基因疗法：载体里的精灵 04

三、长效凝血因子 09

四、口服药解决方案 14

五、平衡的艺术 18

六、血友病关节损伤问题 22

七、血友病最佳动物模型——狗 26

八、观点：治疗血友病的新希望 29

下一期（2016年1月刊）预告：寻找疾病的真相——突变

下一期《生命奥秘》将以《寻找疾病的真相——突变》为专题，介绍最近几年人类遗传学领域的研究进展。技术进步让检测突变和寻找疾病相关突变变得简单快捷。识别和瞄准致癌突变技术开辟了一个崭新的、重要的研究领域。新的基因编辑工具，对性状遗传结构理解的加深，外加上生殖技术，为清除或缓解突变造成的负面影响提供了新的可能。

热 点

肠道菌群与大脑发育 32

百 态

章鱼：美在简单 39

饶舌鳐鱼：听力随年龄一起成长 41

本刊文章主要由国外网站文章编译而成，如有版权问题，请版权所有人与本刊联系。
凡本刊所载文章，版权归作者本人和本刊所有，如需转载，请注明作者及出处“生命奥秘”。
本刊提供的任何信息都不能作为医疗凭证和依据，仅供科研参考。

专题

Worthy Issues

血友病

前言

目前，出血性疾病——血友病被彻底治愈的希望越来越大。因为长效凝血因子的出现让血友病的治疗方法不再繁琐，与此同时，基因疗法的出现也提供了一套有潜力的治愈方案。

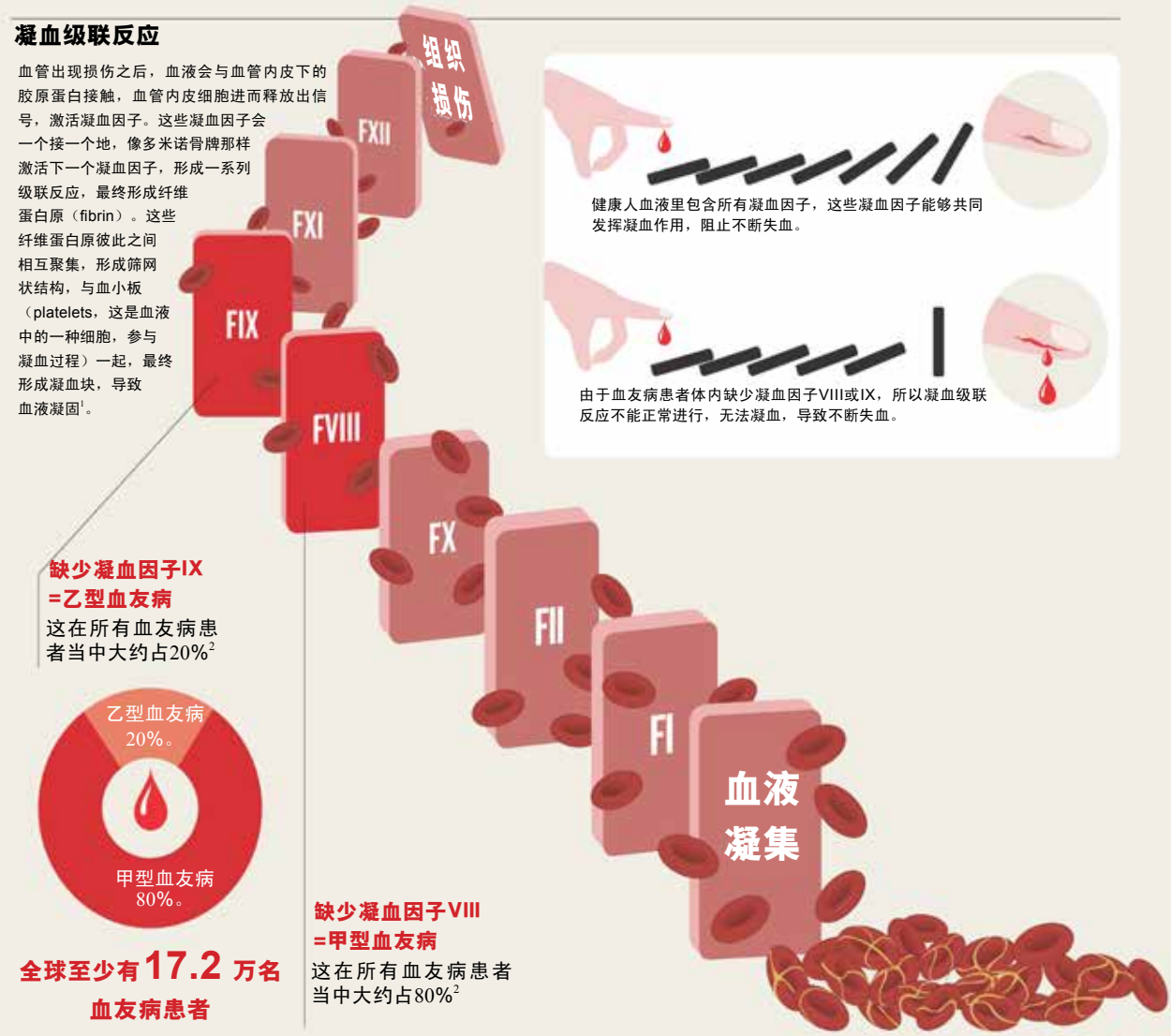
一、遗传性疾病——血友病简介

遗传性疾病——血友病简介

血友病（haemophilia）这种遗传性疾病是一种因为人体内缺少了凝血因子而导致的出血性疾病。全世界有数万名血友病患者，而且与历史上的多起著名事件都有关。

凝血级联反应

血管出现损伤之后，血液会与血管内皮下的胶原蛋白接触，血管内皮细胞进而释放出信号，激活凝血因子。这些凝血因子会一个接一个地，像多米诺骨牌那样激活下一个凝血因子，形成一系列级联反应，最终形成纤维蛋白原（fibrin）。这些纤维蛋白原彼此之间相互聚集，形成筛网状结构，与血小板（platelets，这是血液中的一种细胞，参与凝血过程）一起，最终形成凝血块，导致血液凝固[1]。



健康人血液里包含所有凝血因子，这些凝血因子能够共同发挥凝血作用，阻止不断失血。

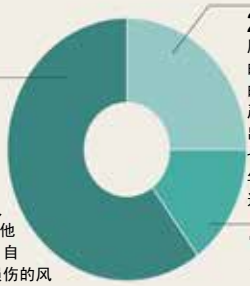
由于血友病患者体内缺少凝血因子VIII或IX，所以凝血级联反应不能正常进行，无法凝血，导致不断失血。

缺少凝血因子IX
=乙型血友病
这在所有血友病患者当中大约占20%[2]

缺少凝血因子VIII
=甲型血友病
这在所有血友病患者当中大约占80%[2]

全球至少有17.2 万名血友病患者

在所有血友病患者当中……



60%
的血友病患者属于病情非常严重的患者，他们体内的凝血因子的水平连正常人的1%都达不到[3]。他们受伤之后出血、自发性出血、关节损伤的风险都非常大。这些患者的平均确诊年龄为1个月。

25%
属于病情较轻的患者，他们体内的凝血因子的水平大约为正常人的6~30%[3]。他们只会在遭受比较严重的损伤、意外或手术时才会出血。女性患者在经期的血量也偏大。这些患者的平均确诊年龄为3岁，他们如果没有遭受过严重的损伤，通常都不会被确诊。

15%
属于病情中等的患者，他们体内的凝血因子的水平大约为正常人的1~5%[3]。这些患者会在受伤后出血，存在一定的自发性出血和关节损伤的风险。这些患者的平均确诊年龄为8个月。

治疗历程

全世界大约有2/3的血友病患者因为医疗费用问题而得不到凝血因子预防治疗。

1840

1840s
出现了首例对出血的血友病患者进行的输血治疗

皇家疾病

Victoria女王是一名血友病基因携带者，她体内携带自发性基因突变（spontaneous genetic mutation）[4]

Victoria女王
1819-1801

Albert王子
1819-1861

Victoria女王将该致病基因遗传给了Leopold王子（他在31岁时死于出血）和Alice及Beatrice这两名公主。

Victoria　Edward VII　Alfred　Helena　Louise　Arthur　Ludvig IV

Alice
1843-1878

Leopold
1853-1884

Beatrice
1857-1944

血友病基因在整个欧洲皇族内继续传播，“受害者”就包括Victoria女王的曾孙，最后一位俄国沙皇Nicholas二世的儿子——Alexei Romanov。

巫医Rasputin宣称他能够治好Alexei的血友病，他对Nicholas二世一家的影响也导致了俄国革命的爆发。

2009年，对Alexei的DNA进行测序发现，Victoria女王携带有乙型血友病致病基因。

Alexandra
1872-1918

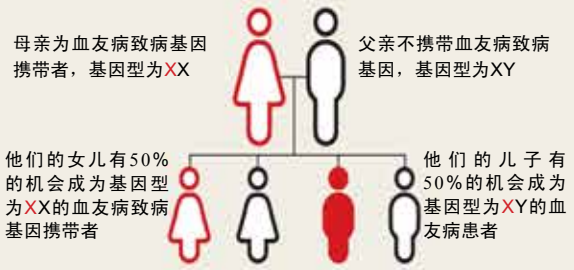
俄国沙皇
Nicholas二世

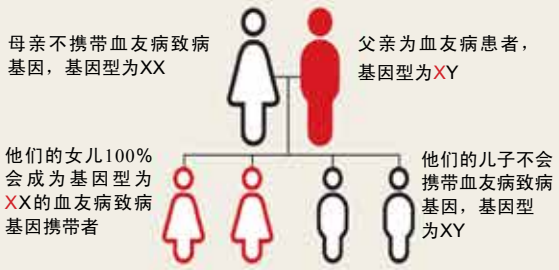
Alexei
1904-1918

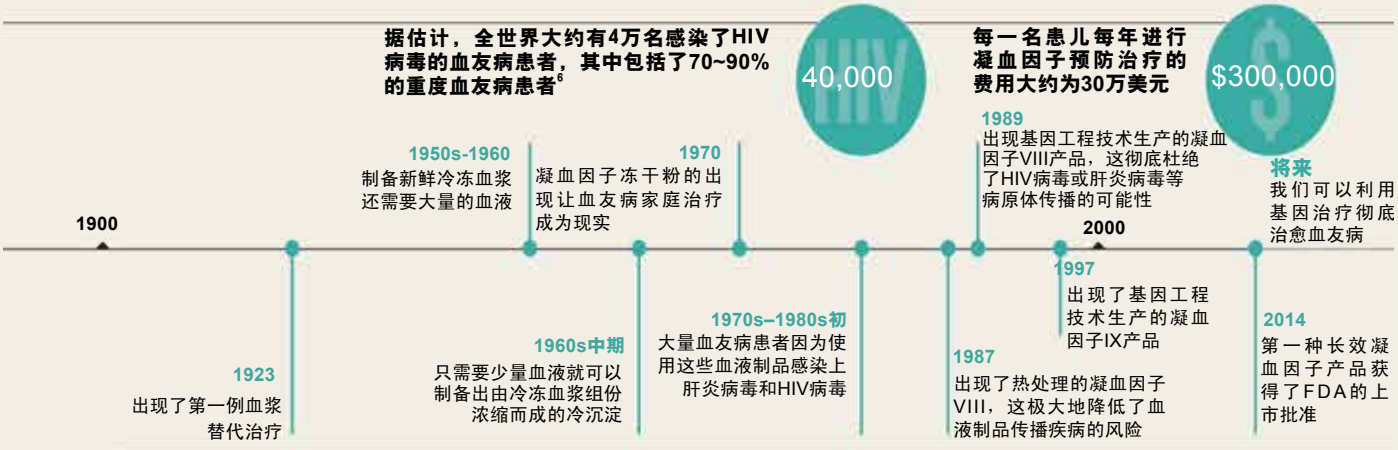
血友病的遗传模式

血友病致病突变基因位于X染色体上，所以女性通常为携带者，她们的儿子有50%的机会会成为血友病患者，而她们的女儿有50%的机会会成为血友病致病基因携带者。血友病男性患者的儿子不会患上血友病，但是他们的女儿都会是致病基因携带者。有一种比较少见的情况就是，女性如果两条X染色体都携带有致病基因，她们也会成为血友病患者，这种情况在女性患者中的比例还不到10%。大约有1/3的患者是因为自发突变而患病的[5]。

不携带血友病致病基因
携带血友病致病基因，但不是血友病患者
血友病患者



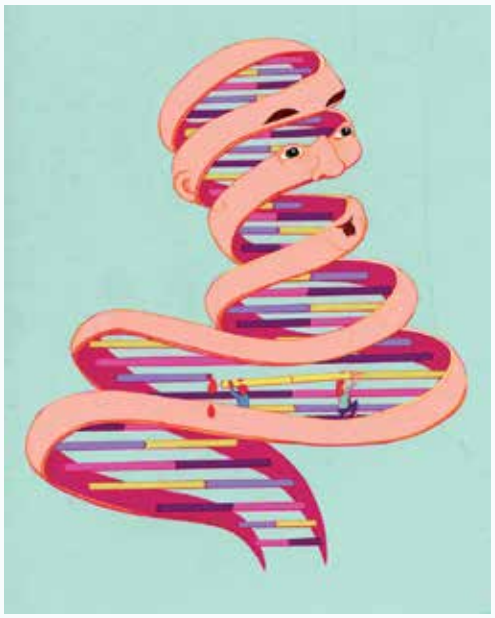




References: 1. Pipe, S. W. (Ed.) The Hemophilia Report (2014) available at: www.hemophiliareport.com 2. 2012 World Hemophilia Foundation Survey, covering 91% of the world's population; 3. US National Hemophilia Foundation 4. Rogaev, E. I. et al. Science 326, 817 (2009). 5. US Centers for Disease Control and Prevention 6. Starr, D. Blood: An Epic History of Medicine and Commerce, p346. Harper Perennial (2000). 7. Manco-Johnson, M. A. et al. N. Engl. J. Med. 357, 535-544 (2007).

HULTON/GETTY; THE PRINT COLLECTOR/GETTY; IMAGEPAST/ALAMY; FINE ART IMAGES/HERITAGE IMAGES/GETTY; HERITAGE IMAGE PARTNERSHIP LTD/ALAMY

二、基因疗法: 载体里的精灵



修复血友病（haemophilia）致病基因将有望彻底治愈这种遗传性疾病，不过这么做也存在相当大的挑战。

Martin一直都没学习过骑自行车，也没有和他的小伙伴们一起踢过足球，他小时候在花园里玩耍时都要戴一个头盔，以免摔伤了头部。Martin的父母的确应该如此小心地照顾他，因为他患有严重的乙型血友病（haemophilia B），这意味着，哪怕是非常轻微的伤害都会让他血流不止，直至虚脱。Martin表示，血友病真让人崩溃，你非常想和其他小朋友一样，可你就是做不到。

乙型血友病这种遗传性疾病的患者因为基因突变，体内缺少一种名为凝血因子IX的蛋白质，而凝血因子IX是一种能够帮助机体凝血的重要因子。目前对于血友病患者的治疗措施是每周进行多次凝血因子注射。这种补充疗法能够帮助他们凝血，但是并没有从根本（病因）上解决问题，也不能彻底地缓解出血问题。

几年前，Martin辞去了卡车司机的工作。据他介绍，他没能完成公司的任务，因为他不能像其他卡车司机那样正常地工作。而Martin的关节腔出血让他的每一步活动都疼痛难忍。2011年，已经被关节腔出血引发的关节退行性变及疼痛折磨了37年的Martin自愿参加了英国伦敦皇家自由医院（Royal Free Hospital in London）开展的一项血友病基因治疗临床试验，希望能够从中获得一点帮助。

这种基因治疗不是给患者注射凝血因子，而是让患者的身体能够自己重新产生凝血因子。这项实验采用的是携带有正常凝血因子IX编码基因的AAV8病毒载体，实验人员将这种病毒注入志愿者的肝脏，希望病毒能够在患者的肝脏内表达出具备正常凝血功能的凝血因子IX。

此次实验一共有6名患者参加，其中有4人在接受基因治疗之后都已经不再需要进行凝血因子补充治疗了。Martin就是幸运儿之一，在接受基因治疗之后，他体内凝血因子IX的水平有了明显的提升，他的血友病病情也已经从重度改善成了轻度。到目前为止，他体内凝血因子的水平还一直保持在一个稳定的水平。

这次临床试验的成功对于本次试验的负责人，英国伦敦大学学院（University College London）血友病名誉退休教授Edward Tuddenham意义重大。他不仅想找到一种能够彻底治愈乙型血友病的方法，更想为发病率更高的甲型血友病患者服务，彻底治好他们的疾病，但治疗甲型血友病的难度却要大得多。

自由地表达

AAV8病毒载体是治疗乙型血友病的最佳选择，但是用来治疗甲型血友病时却表现得不够理想。这主要是因为甲型血友病患者体内缺乏凝血因子VIII，而凝血因子VIII的编码

基因要比凝血因子IX的大6倍，这么大的一个基因不太适合用AAV8这种载体来装载。为了解决这个问题，科研人员们常常会从凝血因子VIII编码基因中切出一段4500bp 的片段，该片段主要编码凝血因子VIII的B结构域（B-domain），而这段结构域的主要功能就是保证凝血因子VIII能够以较高的效率进行分泌。Tuddenham等人希望用一段长度只有300bp（相当于原长度1/15），但具备同样功能的片段来替换这个结构域B编码片段。不过他们在2010年时开展的血友病小鼠动物实验却显示，这种替换无法让小鼠血液内的凝血因子VIII维持在正常水平。所以从那以后，Tuddenham的工作重点就是不仅要修正突变的基因，而且还要确保基因被修正之后能够正常地表达。

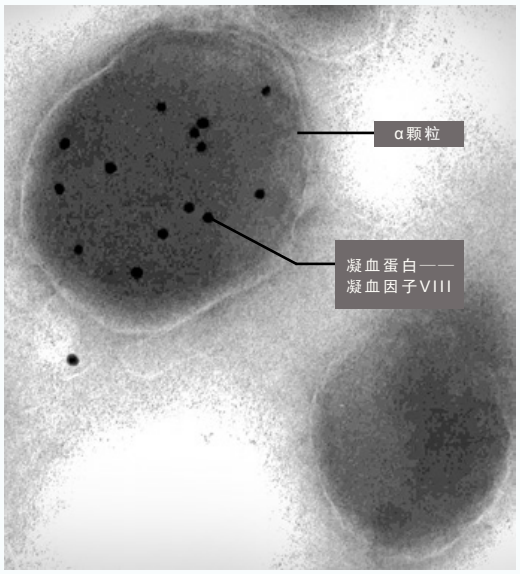
凝血因子VIII基因表达的速度会部分地受到DNA起始密码子位置的影响。在人类和小鼠凝血因子VIII编码基因里，起始密码子的位置都不会让该基因大量表达。“所以我们应该用作用更强的起始密码子来进行替换。”Tuddenham这样说道。他们也这么干了，结果实验小鼠的凝血因子表达水平从2%一下子增加到了2000%。这种密码子优化的功效让Tuddenham大吃一惊。

2015年，Tuddenham等人希望对甲型血友病患者进行一项1期临床试验，以查看他们这种凝血因子VIII密码子优化基因疗法是否安全、有效。他们计划招募10至20名甲型血友病患者志愿者参加试验，但即便这些志愿者体内都能够有效地表达出正常的凝血因子VIII，以后还是有很多问题需要去解决的。

血小板载体

障碍之一就是AAV8病毒载体只能给人体注射一次，因为这种病毒会刺激人体产生强烈的免疫反应。据Tuddenham介绍，AAV8病毒注射一次之后你就再也不能用它了。你已经对这种病毒免疫了。所以虽然从理论上来说，基因治疗是一种一劳永逸式的治疗方案，但是如果在治疗效果还没有达到之前就产生了免疫反应，那么这次治疗就白费了。

美国威斯康辛研究所附属儿童医院（Children’s Hospital of Wisconsin Research Institute in Milwaukee）的David Wilcox希望用人体自身的细胞做载体，以解决这个免疫排斥问题。他正在开发一种新技术，希望将凝血因子VIII编码基因塞进一种名为α颗粒（α-granules）的结构当中，而α颗粒就是人体血小板（platelets）里的一种结构。在人体组织受伤之后，血小板是最早出现在受损部位的细胞，它们很快就可以释放出化学信号，在受损处形成凝血块。Wilcox正在想办法对血小板进行遗传学改造，使其能够表达出有功能的凝血因子VIII。他指出，用血小板做载体，彻底解决了使用AAV病毒带来的免疫排斥问题，同时也解决了在注射凝血因子VIII之后，这些蛋白质在人体内分布得到处都是，不能将好钢用在刀刃上的问题。



科研人员对血小板进行了遗传学改造，希望这些血小板里的α颗粒能够在受伤处释放出有功能的凝血因子VIII。

不过Wilcox首要的是从血友病患者体内收集到足够的造血干细胞。他首先用生长因子刺激骨髓里的造血干细胞，使其进入外周血循环系统，然后再通过外周血造血干细胞收集（peripheral blood stem cell apheresis）技术进行收集。这些在外周血当中大约占到2~5%的造血干细胞会接受遗传学改造，并用于基因治疗。患者们需要接受短暂的化疗，来抑制自身的造血干细胞，然后再给他们注入已经改造好的造血干细胞，进行基因治疗。这些人工造血干细胞进入人体之后会再回到骨髓内，继续生长、分化出能够表达凝血因子VIII的血小板。

2013年，Wilcox对3只患有甲型血友病的狗进行了动物实验，结果其中两只在接受基因治疗之后不再需要继续注射补充凝血因子VIII了。而且与预期的一样，所有3只实验狗体内都没有发现针对人凝血因子VIII的抗体，而且实验狗被割伤之后，伤口处能够立即止血。据Wilcox介绍，他们认为，这些血小板能够在受伤处迅速释放出凝血因子VIII，这些凝血因子能够在机体免疫系统还没来得及启动之前就立即发挥止血功效。与Tuddenham等人一样，Wilcox的团队也希望能够在2015年年内开展人体临床试验。

不过即便血小板能够解决载体的问题，病人们可能也不太愿意接受这种方案。Tuddenham认为，这种方案对于体内存在抗AAV病毒抗体，或者受到HIV或HCV病毒影响的人可能还行，但是对于大部分人来说，在开展基因治疗之前的那段化疗可不是那么容易接受的。

基因纠正治疗

到目前为止，基因治疗试验针对的患者还都全是成年血友病患者，不过作为遗传性疾病，血友病患者其实从一出生就已经受到这种疾病的影响了。不幸的是，基因治疗不能够用于儿童。如果未成年人的肝脏内注入了AAV病毒载体和凝血因子VIII基因，那么最开始，凝血因子的表达量会升高，就好像Tuddenham在2011年开展的试验里看到的那样。但是据美国宾夕法尼亚州费城儿童医院（Children’s Hospital of Philadelphia in Pennsylvania）的血友病专家Katherine High介绍，随着这些孩子不断成长，他们的肝细胞不断增多，但是这些新生肝细胞内不存在凝血因子编码基因，所以这些凝血因子的表达量会逐渐降低。

理论上说，Wilcox的方案就不存在这个问题，是可以应用于血友病儿童患者的，因为凝血因子编码基因已经整合到造血干细胞的基因组内，可以不断地传递给新生的细胞。不过在临床实践中，没有哪个负责任的医生敢对血友病这种非致死性疾病患儿使用化疗药物。

有一个办法可以解决这个问题，那就是体内基因组编辑（in vivo genome editing），即纠正人体内出错的基因，使其恢复正常，而不再使用外源的正常基因来替代它的功能。这种疗法可以应用于任何年龄段的患者，而且越早进行治疗，效果越好。

据澳大利亚悉尼新南威尔士大学（University of New South Wales, Sydney, Australia）的Merlin Crossley介绍，从理论上来说，这种基因纠正疗法其实非常简单，就是先将人体内发生突变的那段错误基因切下来，然后再用一段正常的序列补上去就行了。Crossley认为基因纠正治疗才是治疗血友病的最佳选择。

而且这种治疗方案尤其适合儿童患者。随着肝细胞的不断增殖，新生肝细胞内同样也会遗传正常的凝血因子编码基因。而且机体不会排斥这些自身表达的凝血因子，所以能够彻底治愈血友病。Crossley表示，用于替换的基因片段克隆自正常人体，所以不会被人体的免疫器官当做异源物质，也就不会发生免疫排斥反应。

一项在2011年由High领导开展的小鼠动物试验表明，基因组编辑治疗方案确实可行。他们在血友病动物模型小鼠一出生就立即进行了实验，其中一组小鼠接受Tuddenham的基

因转移治疗，另外一组小鼠则接受基因纠正治疗。结果发现，接受基因纠正治疗的小鼠凝血因子表达水平更高，而且部分切除了它们的肝脏之后，凝血因子的表达量还是能够维持在较高的水平，而接受基因转移治疗的小鼠体内凝血因子表达量则会逐渐下降。所以High认为，这就是基因纠正治疗的优势，尤其对于儿童患者而言更加明显。

使用基因组编辑技术需要对突变的基因片段进行非常精准的修复，可是甲型血友病患者的突变基因里含有超过2000处突变，所以修复起来也比较困难。

鉴于此，High和Tuddenham都认为，短期内还不太可能使用基因组编辑技术来治疗血友病。High表示，基因转移治疗从小鼠动物实验到人体临床试验花了14年之久。在基因编辑技术应用于成年人体之前，我们首先要对大型的动物进行试验，而这还有很多问题需要解决，所以离儿童患者的治疗就更远了。

Martin经过治疗之后，已经从之前的重症血友病患者变成了轻症患者，这已经极大地改善了他的生活质量。他现在接受凝血因子注射治疗的次数已经减少到十次以下，而且只发生过一次严重的出血。他表示，下决心参加这次临床试验可不容易，因为之前还没人做过类似的试验，所以他完全不知道可能会发生什么。不过他相信，他的成功经历可以给今后参加临床试验的人更多信心。Martin说道：“参加临床试验就好比让我们从一个完全熟悉的环境进入到一个未知的状态，这会让人感到不安，我希望我的经历能够给后来者更多的帮助，尽量减少他们的不确定感，让他们安心。”

资讯 · 频道

www.LifeOmics.com

特约编辑招聘启事

为了及时收集生命科学最新资讯、提高《生命奥秘》办刊质量，现面向从事生命科学或对这学科有浓厚兴趣的科研人员、学生诚聘特约编辑（兼职）。

职位职责：

独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

选题要求内容新颖、评述精辟、注重时效和深入浅出。尤其欢迎以自身系统研究为基础的高水平译述与评论，结合所从事的科研工作提出自己的见解、今后设想或前瞻性展望。

要求：

1.具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
2.具备良好的生命科学前沿触觉；
3.具备较高的外文文献翻译、编译水平；
4.具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
5.具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 editor@lifeomics.com

三、长效凝血因子

延长凝血因子（clotting factor）的寿命也可能是改善血友病患者生存质量的途径之一。

这名血友病患儿正在接受静脉注射，以补充凝血因子，治疗疾病。

对于血友病患儿的家长来说，得知自己孩子的患病消息既是个坏消息，也是个好消息。好消息就是，这些孩子（生活在发达国家里）能够如普通人一样正常地生活，要知道在20世纪70年代，他们的平均寿命只有20岁。坏消息就是，家长们得学会静脉注射技术，要懂得给自己的孩子注射凝血因子，进行治疗。患儿大约每两天就需注射一次，而且这种治疗是需要持续终身的。

不过随着科技的进步，治疗会变得越来越方便，越容易。基因治疗以及其它的一些治疗手段有望给这些血友病患者提供疗效更加持久的帮助。目前，在治疗方面的进展就是出现了一种新型的、疗效维持时间更长的凝血因子。这就能够让之前每两天注射一次的治疗方案变成了几天，甚至是几周。美国食品与药品监督管理局（FDA）已经在今年的早些时候批准了两款该类药品上市。这也是市面上第一次出现这种药品，更多的同类药品也正在开发之中，其中有许多都预计在年内上市。随着这类药品的出现，血友病患者的治疗也会变得越来越简单。这会进一步提高患者对治疗的依从性，减少（注射相关）并发症的发生几率，而且能够让更多的人像正常人一样生活下去。

用凝血因子替代疗法来治疗血友病源于20世纪40年代，不过当时使用的是输全血的方法。到了20世纪60年代末，市面上出现了能够防止自发性出血的家用冻干凝血因子。20世纪90年代，血友病治疗又更进了一步，患者不再使用从人血中分离的凝血因子成分，而开始使用由重组DNA技术直接生产的凝血因子，这就避免了（成份）输血带来的疾病传播等风险。由（成份）输血导致的病毒传播问题曾经在20世纪70年代和80年代给整个血友病病患群体带来了极大的问题。

不过预防疗法（prophylactic treatment）也一直存在问题。这些输入人体内的外源凝血因子在人体内存活的时间不是很长。比如外源性凝血因子VIII在甲型血友病患者体内的半衰期是8~12个小时，而外源性凝血因子IX在乙型血友病患者体内的半衰期也只有18~24个小时而已。这也就意味着血友病患者每两、三天就必须注射一次凝血因子，而静脉注射又存在一定的难度。据加拿大皇后大学（Queen’s University in Kingston, Ontario, Canada）的病理学教授、分子医学家David Lillicrap介绍，血友病患者对于治疗的依从性一直都不是太高，这是因为他们需要在家里给自己做治疗，这就是问题所在。

2001年开展的一项调查表明，有40%的重度血友病患者都不能按照正规的疗程进行治疗。这些患者非常容易自发出血，导致关节腔积血，进而出现类似于关节炎（arthritis）的关节进行性损伤。他们也比较容易出现颅内自

发性出血，这会导致颅脑损伤，甚至会危及生命。

制药公司对这种寿命更长的凝血因子产品立即作出了反应，使得治疗间隔时间明显延长。美国马萨诸塞州坎布里奇Biogen Idec公司的两款凝血因子产品都在今年获得了FDA的上市许可。其中用于治疗甲型血友病的产品Eloctate在今年6月获批，该产品能够每四天注射一次，临床医生们可以根据需要，将注射间隔控制在3~5天之间。用于治疗乙型血友病的产品Alprolix在今年3月获批，该产品的注射间隔时间更长，对于一部分患者甚至可以做到每10天，或半个月注射一次。其他公司生产的同类产品也都差不多。

美国北卡罗来纳州大学教堂山分校（University of North Carolina at Chapel Hill）从事血友病研究的病理学家及心血管医生Timothy Nichols认为，这绝对算得上是一大进步。血友病不是没办法治，但是每个星期都要给孩子打3针，这真的不太容易做到。

Steven Pipe是美国密歇根大学C.S.Mott儿童医院（University of Michigan’s C. S. Mott Children’s Hospital in Ann Arbor）的一名儿科血友病专家，他也非常赞同Nichols的观点。而且他认为将凝血因子IX的寿命延长了3~5倍，这“非常了不起”，是一种革命性的进步。而且在使用剂量较大时，由于该药物的半衰期在不同患者个体间存在一定的差异，所以有一些患者可能每个月只需要注射一次就够了。

助凝血新药简介

目前有多种助凝血药物正在进行临床试验，或有望在年内获批上市销售。

凝血因子	商品名	制造工艺	出品公司	半衰期（单位：小时）	目前所处研发阶段
凝血因子VIII（用于治疗甲型血友病），传统药物的半衰期为8~12小时	Eloctate	与免疫球蛋白Fc段融合	Biogen Idec公司	20	于2014年6月获得FDA批准
	BAX 855	PEG处理	百特公司	19	预计2014年底获批上市
	BAY94-9027	PEG处理	拜耳制药公司	19	预计2015年年中获批上市
	N8-GP	PEG处理	诺和诺德制药公司	19	预计2018年获批上市
凝血因子IX（用于治疗乙型血友病），传统药物的半衰期为18~24小时	rIX-FP	与白蛋白融合	CSL Behring公司	92	正在进行临床试验
	N9-GP	PEG处理	诺和诺德制药公司	110	预计2015年获批上市
	Alprolix	与免疫球蛋白Fc段融合	Biogen Idec公司	87	于2014年3月获得FDA批准

多出来的时间

这些凝血因子的半衰期之所以能够延长，主要是因为干扰了人体自身清除这些外源因子的天然作用机制。实现这一点主要有三种方案，这三种方案都比较类似，所以每一种方案的结果也都差不太多。唯一的区别就在凝血因子IX上，因为凝血因子IX的半衰期会有明显的延长，这就给治疗带来了本质上的改变。而对于凝血因子VIII，这种半衰期上的延长还没有给临床治疗带来根本性的革新。不幸的是，由于缺少凝血因子VIII而患病的甲型血友病患者的数量是乙型血友病患者的四倍。

人体内也有两种延长蛋白质半衰期的天然机制。人体内的免疫球蛋白的半衰期长达3周。免疫球蛋白是一种“Y”形状的蛋白质，其中“Y”形状下半部的柄状结构被称作Fc段

（Fc region）。如果将凝血因子与Fc段融合在一起，人体就会将这种外源蛋白看作是自身表达的免疫球蛋白，而不会立即将其清除掉，所以能够延长其半衰期，不过仍然无法达到天然免疫球蛋白那么长的寿命。

对于凝血因子VIII而言，这种与Fc段融合在一起的方法可以将其半衰期延长至12~18个小时；而凝血因子IX的半衰期则将延长至一天，甚至是五天。

Biogen公司出品的这两种产品使用的都是这种与Fc段融合的技术。其实市面上早就有使用同类技术开发的药物，比如用于治疗类风湿性关节炎（rheumatoid arthritis）的Etanercept，该药物早在1998年即获FDA批准。美国加利福尼亚大学戴维斯分校血友病治疗中心（Hemophilia Treatment Center at the University of California, Davis）已退休的主任Jerry Powell认为，这些前任药物的成功表明，Eloctate等凝血因子新药也会是安全的。

美国宾夕法尼亚州CSL Behring公司采用的也是非常相似的技术，他们将凝血因子与白蛋白（albumin）进行了融合。白蛋白是人体血液里的主要成分，与免疫球蛋白一样，也具有长达20天的半衰期。他们公司出品的凝血因子IX—白蛋白融合产品在1期临床试验里的半衰期长达4天之久，这比普通的凝血因子IX高出了5倍。不过他们没能成功地将凝血因子VIII与白蛋白进行融合。据Powell介绍，融合之后，凝血因子VIII的正常功能会受到一定的影响。

Powell打比方道，这些蛋白质是非常大的分子，凝血因子VIII的作用机制非常复杂，这就好像一头跳舞的大象，稍微给他加点负担，他就会跟不上节奏一样。第三种方案则稍微有一点不同。这不是将凝血因子与人体内的天然结构进行融合，而是将凝血因子与一种人工合成的聚乙二醇（polyethylene glycol, PEG）分子相结合。这种PEG分子能够在蛋白质周围形成一种淡淡的云雾状结构，从而起到一种保护作用，避免蛋白质分子被机体降解。比如这些PEG可以阻止凝血因子与体内的特异性受体结合，而这种结合则是人体清除凝血因子的主要机制。PEG最终会被人体的肝脏和肾脏清除掉。德国的拜耳制药公司（Bayer in Leverkusen, Germany）、美国的百特公司（Baxter International in Deerfield, Illinois）和丹麦的诺和诺德制药公司（Danish company Novo Nordisk in Bagsvaerd）这三大制药公司都已经开发出了半衰期长达19个小时的PEG 凝血因子VIII产品。百特公司预计今年年内能够获得上市批准，拜耳制药公司可能会在明年，而诺和诺德制药公司的产品则会在2018年上市。

诺和诺德制药公司也在对他们的PEG凝血因子IX产品进行临床试验，该产品的半衰期长达110个小时。该公司表示，他们希望能够在明年提交上市申请。

到目前为止，使用这三种不同技术开发的产品在安全性和疗效方面都没有表现出明显的差异。不过有人担心长期使用PEG之后会在人体的肝脏或肾脏内蓄积，不过多项研究并没有发现PEG对人体存在明显的毒副作用，所以Powell认为，这种担忧是多余的。据他介绍，PEG的使用已经很长时间了，也做过很多毒理学方面的研究，可所有的实验结果都表明是安全的。如果像我们预计的那样，在未来的十年里，基因疗法能够代替目前的治疗，那么PEG就更加不会成为问题了，因为我们不会终身使用这种药物。

用于治疗乙型血友病的凝血因子IX产品。

在血友病的治疗工作中有一个常见的问题，那就是人体内非常容易产生针对凝血因子VIII的抗体，我们也习惯把这种抗体称作凝血因子VIII抑制剂。这是因为，这些外源性凝血因子VIII对于甲型血友病患者也是一种异源物质，所以机体的免疫系统会将其视作外来的威胁，尽力将其清除掉。大约30%的甲型血友病患者体内都会产生这种抑制剂，而一旦出现了这些抗体，治疗就会变得非常困难。不过幸运的是，只有大约4%的乙型血友病患者体内会产生针对凝血因子IX的抗体。

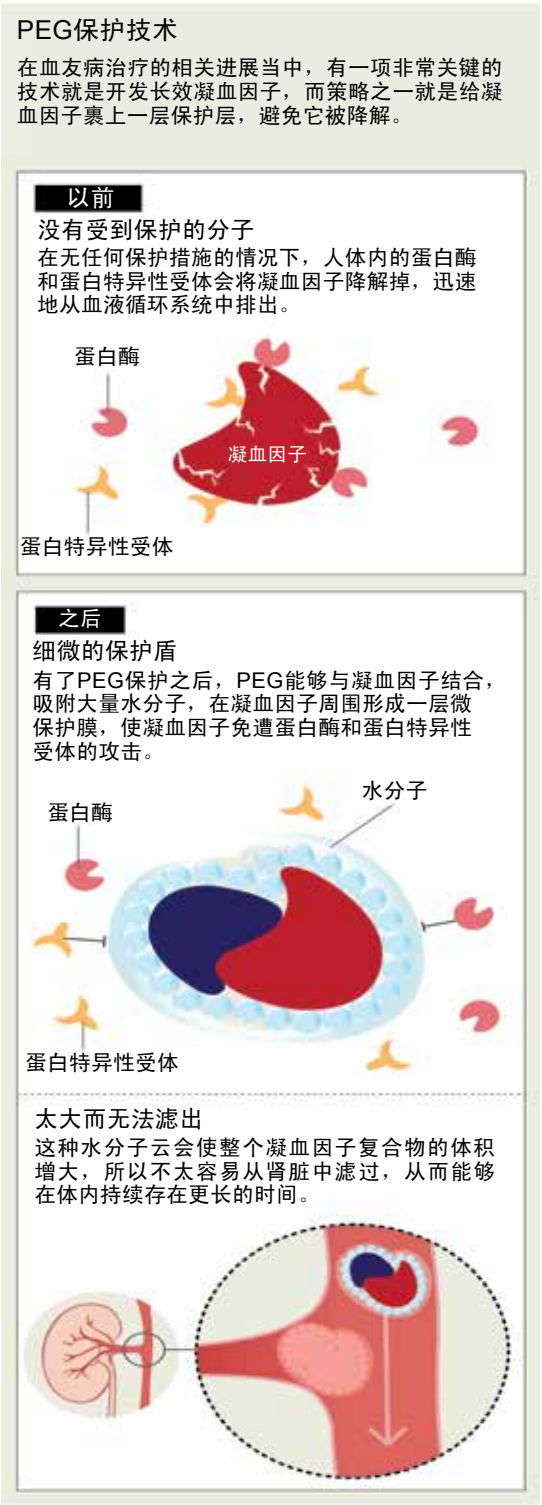
Pipe表示，很多人都对长效凝血因子VIII产品的前途表示担忧，因为他们担心这样会让抑制剂问题进一步恶化。Pipe表示，他们对开展凝血因子VIII的相关研究工作一直都非常谨慎，因为对凝血因子VIII做任何一点的改动都有可能改变其免疫原性（immunogenicity）。毫无疑问，Pipe等人目前采用的这些改造策略在延长药物半衰期方面都有其最大限度。如果要进一步提高，只能在凝血因子VIII的分子结构上动脑筋，做出更大的改变。

PEG可能会有所突破。20世纪70年代的研究就表明，PEG能够减少外源蛋白对机体免疫系统的刺激。不过在血友病患者体内还没有观察到这种现象。Powell则认为，如果这一点真的得到了证实，那将会是一大突破。

级联反应

当然，可能已经有科研人员找到了一种新方法，能够彻底避免抑制剂问题，那就是开发出另外一种与人体凝血因子VIII完全不同，但在作用上又完全一样的新药物，从而让整个凝血级联反应进行下去。

在凝血级联反应中，凝血因子VIII被上级反应激活之后，会招募凝血因子IX和X，继而进行下一步级联反应。日本Nara医科大学血友病中心（Hemophilia Center at Nara Medical University in Japan）的主任Midori Shima就开发出了一种双重识别抗体类药物，完全能够胜任凝血因子VIII的工作。



抗体是免疫球蛋白，这些Y形分子的上半部分能够与其靶标特异性结合。Shima设计了一种抗体分子，该分子的一个上臂结构能够与凝血因子IX结合，而另外一个上臂结构能够与凝血因子X结合，这样就能够像凝血因子VIII一样，将凝血因子IX和X招募到一起，完成凝血级联反应。而且这种抗体药物的半衰期长达30天，要比天然凝血因子VIII 12个小时的半衰期长得多。日本东京的Chugai制药公司和瑞士的罗氏制药公司已经在开展合作，继续开发这种药物了。

他们还没有公布该药物2期临床试验的具体结果，不过据Shima介绍，从他们的临床观察来看，这些受试血友病患者的出血次数明显降低了。在所有6名使用了最低剂量药物的受试者当中，他们在接受试验之前的12周里会有20~60次出血，使用了这种新药之后，有2人在为期12周的实验里一次出血都未发生过。而在所有64名受试者里，只有1人体内检出了抗体。他们正在积极地准备开展3期临床试验。

这种新药还有一大好处，因为它自身就是一种抗体，所以不需要进行静脉注射，而可以像胰岛素那样采用皮下注射的方式进行给药。Shima等人认为，这种新药将彻底改变整个血友病治疗的现状。

Lillicrap也赞同道：“这种抗体药物一旦被证明具备临床治疗功效，那将是一场颠覆性的改变。在一两年内我们就能见真章了。”

使用长效凝血因子除了具有更方便、注射次数更少、患者依从性更高等优势之外，还会带来其它一些帮助。比如如果患者依旧按照以前的注射频率注射长效凝血因子制剂，那么他们体内的凝血因子水平就会更高，他们的远期生活质量也会更好。

据Pipe介绍，如果血友病患者每48小时注射一次长效凝血因子，而且初始血药浓度能够达到和普通人一样的正常水平，那么他们在注射之后的头12个小时内，就能够一直维持在这个正常人水平上。而且在余下的36个小时里，体内的凝血因子虽然达不到正常水平，但是也够用了。不过在最后的6~8个小时里，凝血因子的浓度会非常低，只有不到正常水平的5%左右。临床医生们最需要关注这最后的几个小时，他们必须尽量避免患者在这段时间里，体内的凝血因子水平跌落至正常水平的1%以下，否则患者就非常容易出现自发性出血。

不过，如果此时的凝血因子水平能够更高一点，患者的生活质量也就能够更好一些，比如他们就能够更加没有顾虑地去参加体育运动了。据Pipe介绍，最理想的状态是，血友病患者根本就不用担心出血。但那个阈值在哪，Pipe估计没有人知道。这种次最佳水平（less-than-perfect）的凝血状态还会带来其它好处。如果你能够维持在正常水平的10~15%，那基本上就不会出现关节出血等所有关节方面的问题了。

Lillicrap认为，这些新药的出现也能够让制药公司为发展中国家的血友病患者提供一些帮助。他指出，这些凝血因子将不再是西欧和北美等发达国家患者才能够得到的专享福利。既然制药公司加大了这方面的研发力度，那么至少有部分原因是因为他们看到了全世界（而不仅仅是发达国家）这个广阔的市场。

科研人员们预计，随着科技的进展，这些长效制剂可能会在十年之内被基因治疗所取代。采用基因治疗技术之后，患者自己就能够产生凝血因子，不再需要补充外源的凝血因子了。与此同时，使用这些长效凝血因子制剂也能够改善患者的生活质量。Pipe表示，从临床治愈到彻底治愈这段路，他认为这种长效凝血因子制剂是一个非常好的桥梁，能够起到良好转换的作用。

四、口服药解决方案

在治疗血友病（haemophilia）时容易出现一种很严重的并发症，不过现在我们有望利用莴苣叶（lettuce leaves）制成的药物来预防。

从这些莴苣叶中提炼出来的凝血因子有望彻底解决血友病治疗过程中常见的免疫排斥问题。

Anita碗里的食物可不是普通的狗粮。里面除了有常见的干的、湿的食物之外，还有一些绿色的粉末——最新实验的产物，这种粉末有望解决血友病患者在治疗时出现的可能会让他们致死的一种并发症。Anita是一只患有乙型血友病（haemophilia B）的keagle狗（比格猎犬和凯恩梗杂交的后代），因为Anita的红色外套让她的饲养员想起了101斑点狗（One Hundred and One Dalmatians）里的一个角色，所以给她也起了这个名字。

与人类乙型血友病患者一样，Anita体内也缺乏凝血因子IX这种促凝血因子。如果使用凝血因子（coagulation proteins）进行替代治疗，狗体内会产生抗体，或者叫抑制剂，降低治疗的效果。这种情况在人体内也非常常见，大约有5%的乙型血友病患者都会出现这种情况。在这5%的患者体内，机体的免疫系统会将输入体内的外源性凝血因子视作“危险品”，不再将其视作正常的血液的一份子来接纳，并且在这些外源性凝血因子发挥凝血作用之前就会将其摧毁。如果继续用这些外源性凝血因子进行替代治疗，将有可能诱发危及生命的变态反应，比如过敏（anaphylaxis）。

甲型血友病（haemophilia A）是因为体内缺少凝血因子VIII而导致的一种疾病，其发病率是乙型血友病的四倍。甲型血友病患者的情况会更加糟糕，甲型血友病患者接受凝血因子VIII替代治疗之后，大约30%的患者体内都会产生抗体。

我们现在有一些办法可以将人体内的这些抗体给清除掉。比如有一种叫做诱导免疫耐受疗法（immune tolerance induction therapy）的强化治疗方法，就是定期将这些凝血因子直接注入静脉内。不过这种疗法比较费时间，而且价格昂贵（一个5岁大的患儿平均需要花费100万美元），并且只有大约3/4的患者能够见效。据美国北卡罗来纳大学教堂山分校Francis Owen血液研究实验室（Francis Owen Blood Research Laboratory at the University of North Carolina at Chapel Hill）的主任Timothy Nichols（他们实验室就是培育Anita动物模型的实验室）介绍，治疗这些产生了抗体的血友病患者是相当困难的。

对那些已经产生了抗体的患者，诱导形成免疫耐受是一种解决方案。但如果能够从源头上解决问题不是就可以一劳永逸了吗？加拿大安大略省女王大学（Queen’s University in Kingston, Ontario, Canada）专门从事血液病研究的临床医生David Lillicrap认为，如果能够找到某种方法，诱导机体形成免疫耐受，在

一开始就阻止抗体形成，那对于血友病治疗来说将是一大技术飞跃。

Anita吃的那种绿色粉末也许就能够实现这一切。这种口服药物是莴苣叶冻干粉的提取物。每一片莴苣叶中大约含有1万个叶绿体（chloroplasts），科学家们对这些进行光合作用的细胞器进行改造之后，就可以依靠它们合成凝血因子IX。这些凝血因子还不能用来治疗血友病，因为植物细胞无法让它们合成的凝血因子折叠成与人体内凝血因子一样的正常构象，所以它们还不具备凝血功能。不过这些植物凝血因子可以不让人体对后来输注进体内的外源凝血因子发动免疫攻击。

开发这种植物凝血因子的科研人员在小鼠动物试验中发现，用这些植物凝血因子饲养试验小鼠之后，就能够阻止抗体的产生，也不会再发生严重的变态反应。如果这种治疗方案在Anita的实验中，以及未来的人体实验中同样获得了成功，那么它将成为史上第一种能够预防在血友病治疗过程中常见的免疫反应的药物。

除了Anita之外，还有一只狗也参加了这次的实验，据美国宾夕法尼亚大学口腔医学院转化医学研究中心（translational research at the University of Pennsylvania School of Dental Medicine in Philadelphia）的主任，也是这次实验的首席科学家Henry Daniell介绍，实验到目前为止，一切进展都非常顺利。

免疫耐受的作用

早在2006年，Lillicrap就发现只需要口服一次凝血因子药物，就能够诱导机体的免疫系统产生免疫耐受。他们当时用甲型血友病小鼠动物模型进行了试验，给这些小鼠鼻饲或口服了纯化的人凝血因子VIII。结果发现，在后续多次给试验小鼠注射人凝血因子VIII之后，在一定程度上减少了小鼠体内的抗体滴度。不过这种试验方法没能让小鼠的肠道或鼻腔免疫细胞接触到足够多的人凝血因子VIII，所以没能建立充分的免疫耐受，彻底抑制抗体的产生。

Daniell后来又开发出了另外一种更好的口服方案。他先将研究重点全都集中到乙型血友病上面。Daniell团队采用了一种能够延缓1型糖尿病（type 1 diabetes）发病的方法，对烟草这种植物进行了遗传学改造，使烟草的叶绿体表达人凝血因子IX，现在他们又开始使用莴苣叶。

叶绿体DNA是独立于植物核基因组DNA之外的，在植物细胞里含有大量的叶绿体细胞器，所以一片烟草植物的叶片都能够合成大量的凝血因子蛋白。而且植物细胞的细胞壁能够起到保护作用，能够让这些植物合成的凝血因子不被人体的胃酸破坏、降解掉。到达肠道之后，肠道微生物会降解植物细胞的细胞壁，然后在肠道内释放出植物合成的凝血因子。

Daniell等人为了能够让机体的免疫系统接触到足量的植物凝血因子，又在这些凝血因子上加上了另外一种蛋白质——能够与人体肠道内受体结合的因子。这种凝血因子肠道受体结合因子融合蛋白吸附到肠道内壁之后，人体就能够吸收植物凝血因子，然后被特化的免疫细胞处理，诱导机体产生免疫耐受。

随后，Daniell又与美国佛罗里达大学（University of Florida）的分子生物学家Roland Herzog合作，用动物模型对这种植物蛋白进行了检测。他们于2010年在小鼠动物实验中发现，小鼠口服叶绿体表达的凝血因子IX之后，血液中几乎检测不到凝血因子抗体，而且实验小鼠再也没有发生过过敏性休克等严重的变态反应。据Herzog介绍，这些小鼠都非常健康，它们完全没有表现出任何与变态反应有关的征象，而且体内也没有出现相关的抗体，这个实验结果让他们非常激动。

然后Daniell又利用烟草植物表达了凝血因子VIII，并且将冻干粉寄给了Herzog。他们的研究团队在今年早些时候用甲型血友病小鼠动物模型研究发现，这种植物凝血因子不仅能够明显抑制抗体产生，而且还能够让之前已经形成的抗体逆转、消失。

特异性抑制抗体形成

还有一些方法可以抑制抗体形成，比如使用免疫抑制剂（immunosuppressants）或者特异性清除某种免疫细胞的药物等。不过这些方法都有很大的副作用，比如会明显增加被各种病原体感染的几率等。

美国马萨诸塞州的Selecta生物科技公司（Selecta Biosciences）给我们提供了另外一种更为安全的方法。Selecta公司开发了一种纳米颗粒型的药物（nanoparticle），在这种由生物降解塑料构成的150纳米大小的纳米颗粒中包裹了一种能抑制免疫反应的药物（immune-modifying compound）。当这种药物与凝血因子VIII一同被注射入甲型血友病小鼠动物模型之后，这些纳米颗粒会将其中包含的药物定向输送给淋巴组织里与天然免疫反应机制相关的细胞。然后，这些细胞会让特异性识别凝血因子VIII的免疫细胞形成免疫耐受，从而抑制特异性针对凝血因子VIII的抗体生成，但不会影响其它免疫功能。

David Scott与他在美国马里兰州贝塞斯达美国健康科学统一服务大学（Uniformed Services University of the Health Sciences in Bethesda, Maryland）的同事们一起与Selecta公司开展了科研合作，他们发现，在使用这种纳米颗粒之后，体内至少有半年的时间都检测不到凝血因子抗体。据Selecta公司的首席科学官Takashi Kei Kishimoto介绍，该实验结果表明，他们的确让免疫系统对凝血因子VIII产生了免疫耐受。

这种纳米颗粒技术还可以从其它方面（比如在临床研究中最前沿的基因疗法等）改善血友病的治疗。科研人员们使用常规的基因疗法已经能够在成年乙型血友病患者体内长期表达凝血因子IX，而且这些凝血因子的表达量足以起到缓解病情的作用。并且以目前报道的（小规模）临床试验资料来看，这种以病毒为载体的治疗方法也没有刺激机体产生凝血因子抗体。

不过这种常规的、以肝脏为靶器官的基因治疗手段还是存在诱发一系列并发症的风险的，比如可能会出现有害的基因突变，机体会对病毒载体发动免疫攻击等。所以很多课题组都计划用这种纳米颗粒来替代病毒载体。

防止口服药物降解

编码凝血因子基因序列的DNA质粒（plasmids，一种环状DNA结构）与由壳聚糖（chitosan，这是一种在甲壳动物外壳里发现的多糖，非常坚硬）制成的纳米颗粒将共同组成纳米药物。壳聚糖能够对DNA质粒起到保护作用，避免它在胃内被降解，使其顺利抵达肠道。据加拿大麦克马斯特大学（McMaster University in Hamilton, Canada）专门从事基因治疗研究的Gonzalo Hortelano介绍，口服药物有非常大的吸引力，关键就在于找到一种绝对安全，又能够对药物起到持久有效保护（避免其被消化）的包裹层。”

Hortelano等人，以及德国和美国的科学家们都发现，这种口服DNA药物并不会刺激人体的免疫系统。实际上，甲型和乙型血友病小鼠动物模型试验都发现，小鼠肠道粘膜接触到这种纳米颗粒DNA表达的蛋白质之后可以抑制机体产生相应的抗体，所以能够正常发挥凝血因子的凝血功效。所以亲自开展过这种试验的德国法兰克福红十字血站（German Red Cross Blood Donor Service in Frankfurt）的输血专家Jörg Schüttrumpf认为，这种技术对于血友病患者就是一大福音。

植物表达蛋白——从树叶到冻干粉到胶囊。

美国纽约哥伦比亚大学（Columbia University in New York City）的生物医学工程师Kam Leong的课题组就是第一个成功进行纳米颗粒药物小鼠动物实验的科研团队，他们随后对甲型血友病狗动物模型进行了同样的实验，并且观察到与小鼠动物实验同样的实验结果，基因在狗体内也能够表达，而且可以抑制抗体产生。但是出血时间（bleeding times）却没有改善，如果狗体内表达了足够量的凝血因子VIII，出血时间应该会缩短的。据Leong介绍，他们的实验结果还不够好，还需要进一步优化。

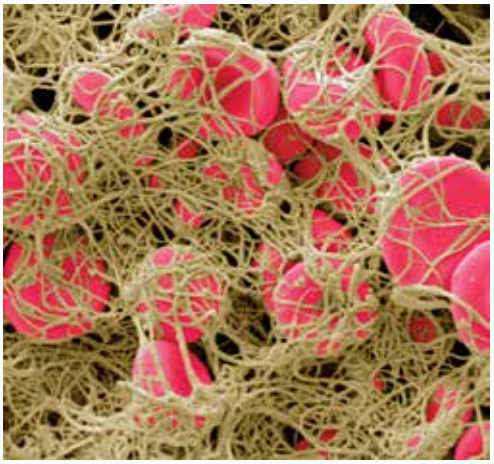
虽然血友病基因治疗方案既能够治疗疾病，同时又可以诱导出免疫耐受，非常的完美，但还是有一些科研人员不太关心这个，他们更关注如何抑制抗体形成。如果解决了这个问题，还是可以用老办法治疗血友病患者，给他们输入外源凝血因子，不需要再担心抗体、变态反应等问题了。

Scott和Herzog的课题组就打算这么干，他们决定用传统的病毒载体基因治疗手段来诱导机体产生免疫耐受。不过他们使用的病毒载体并没有携带编码完整凝血因子的基因序列，他们利用病毒载体让体内的B淋巴细胞表达出了凝血因子片段与免疫球蛋白结合的融合蛋白。通过这种方法，给甲型和乙型血友病小鼠动物模型建立了长时间的免疫耐受。

Herzog认为，开发这些基因治疗技术等于提供了一套两面下注（bet hedging）策略。他指出，每一种治疗方案都有其优势，也有其劣势，他们现在也不知道哪种方案对患者是最有利的。已经有不同的基因治疗技术进入了临床前实验阶段，科研人员和临床医生们也都希望至少有一种新药能够取得成功，解决困扰血友病临床治疗多年的抗体和变态反应问题。

五、平衡的艺术

有一种非常有潜力的血友病治疗新策略，它不是补充促凝血因子，而是想办法抑制凝血抑制因子。



凝血过程就是凝血机制和抗凝血机制取得平衡的一个生理过程。

Kanjaksha Ghosh医生此生已经接诊了一千多名血友病（haemophilia）患者，他一直都在想一个问题，为什么有一些血友病患者会自发性出血，引起关节问题，而另外一些患者却很少出现这些问题。

Ghosh医生是位于印度孟买的印度免疫血液国家研究院（National Institute of Immunohaematology in Mumbai, India）的院长，他还记得曾经接待过的一位血友病患者，那名患者是一名士兵，曾经与印度东北部的反叛武装战斗过。他一直都不知道自己患有血友病，直到有一天，在战斗中负伤之后，才被诊断患有血友病。不过这名患者的哥哥也是一位血友病患者，但他却几乎只能长期卧床休息。

Ghosh医生从上世纪九十年代就开始对这样的血友病家族展开研究，试图找出让他们的病情轻重程度不一的原因。Ghosh医生对那些病情较轻的患者进行了基因组分析，结果发现这些患者不仅凝血因子编码基因里出现了突变，另外一个基因也发生了突变。这种突变的结果是使携带者的血液呈高凝状态，容易导致血栓形成（thrombophilia）。所以Ghosh认为，那些同时携带了高凝突变的血友病患者自发性出血的几率较低。

凝血过程是一个受到一系列蛋白因子精确调控的生理过程，其中一部分因子的作用是促进凝血，而另外一部分因子的作用则是抑制凝血。凝血因子过少会使人容易出血，而过多则会形成血栓、堵塞血管，引起中风或心肌梗死等疾病。目前临床上使用的血友病治疗方案都是补充方案，即人体内缺少哪些凝血因子就补充哪些凝血因子，以此来恢复机体正常的凝血平衡。不过还有很多像Ghosh医生接诊过的那名血友病士兵患者一样的真实个体都向我们表明，还有另外一种治疗血友病的方案，即抑制抗凝血途径，也能够治疗血友病。

近几年来，有三家制药公司也开发出了这样的抗凝血抑制剂产品，而且已经开展了临床试验。他们希望这种新药能够获得与现有血友病治疗药物同样的功效，但是使用起来会更加方便。血友病患者们现在每周都需要注射好几次凝血因子，有了这些新药之后，可能注射的频率会大大降低。

锁定治疗目标

复杂的凝血调控机制会在血管受到损伤的第一时间形成凝血块，阻止出血。在这个过程中，有几个蛋白因子起到了关键的控制作用，阻止凝血作用不受控制地持续下去。组织因子

途径抑制物（tissue factor pathway inhibitor, TFPI）就是其中之一，它能够在凝血机制发挥作用的最初阶段起到抑制作用。近二十年来的研究表明，抑制TFPI因子的作用就可以起到促凝血的作用，这些TFPI因子抑制物就有望用来治疗血友病。

丹麦的诺和诺德制药公司（Novo Nordisk）早在上世纪九十年代就开始开发能够抑制TFPI因子的抗体类药物。该公司的科研人员发现，这些抗体药物能够让血友病患者的血液加快凝固。他们还对血友病兔子动物模型进行了试验，结果发现这些药物能够明显缩短兔子受伤之后的出血时间，促进凝血。这些研究结果都证明了这些药物的治疗潜力。不过诺和诺德制药公司后来改变了研究方向，这些抗TFPI药物的研发工作也随之终止了。

2006年，诺和诺德制药公司决定开发能够通过皮下注射给药方式来治疗血友病的新药，于是又重新启动了抗TFPI药物的研发工作，并且于2010年在欧洲和亚洲为这些名为concizumab的抗TFPI单克隆抗体药物进行了1期临床试验。他们一共招募了28名健康的志愿者，和24名血友病患者参加临床试验。实验中，研究人员分别用静脉给药方式和皮下给药方式给他们注射了concizumab药物。在2013年的阿姆斯特丹国际血栓及止血大会（International Society on Thrombosis and Haemostasis meeting in Amsterdam）上公布了临床试验结果。研究表明，concizumab药物是安全的，也能够明显改善人体的凝血功能。参加试验的志愿者都没有发生明显的副作用，不过有一位健康志愿者在注射了最大剂量的concizumab药物之后，体内形成了一个无法自我溶解的小血栓。

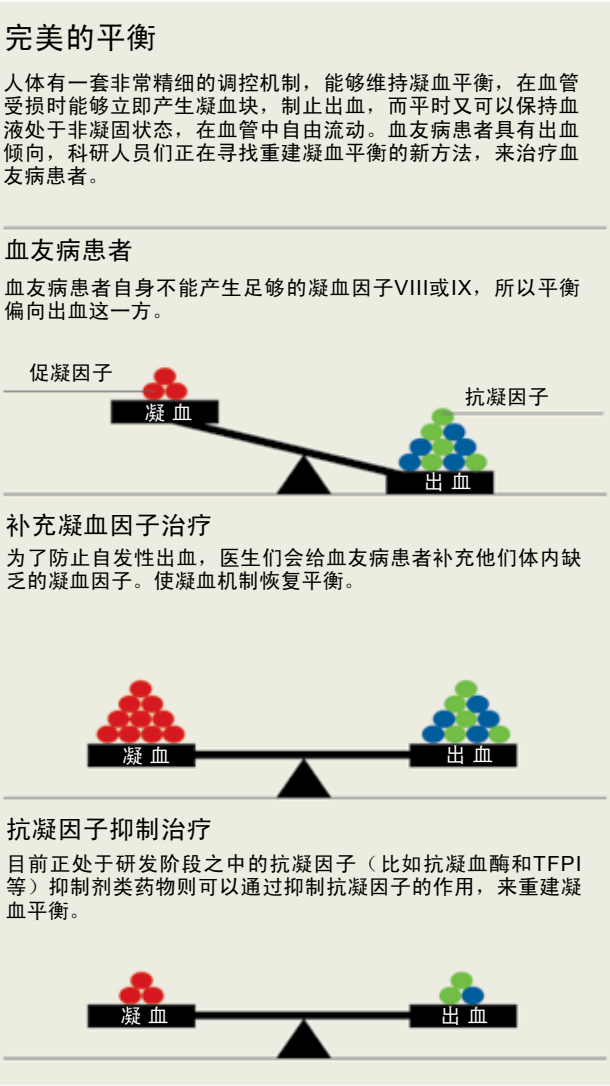
诺和诺德制药公司计划于2015年年中启动第二阶段的临床试验工作，摸索concizumab药物的最佳使用剂量，为将来的临床应用做好准备。据诺和诺德制药公司concizumab项目的科学负责人Ida Hilden介绍，TFPI一直都是他们锁定的治疗目标。

美国的百特制药公司（Baxter International, based in Deerfield, Illinois）一直都在销售治疗用于血友病的重组凝血因子产品，不过他们也在关注TFPI因子。就在诺和诺德制药公司启动concizumab 1期临床试验的同一年，百特制药公司也向Archemix公司购买了一整套血友病相关产品。其中就包括了一种TFPI抑制剂，而且该药物已经在英国开始进行安全性测试了。这种TFPI抑制剂是一种核酸配体类药物（aptamer），它是一种核酸分子，也能够像抗体那样，与TFPI因子结合，抑制其活性。

这种名为BAX 499的药物在动物实验中表现良好，但是在人体实验中却败下阵来。在人体实验中，由于出血事件不断发生，百特制药公司不得不于2012年提前终止了该药物的临床试验工作，这对百特制药公司是一个很大的打击。据位于维也纳的百特生物科技公司（Baxter BioScience in Vienna）的研发副总裁Fritz Scheiflinger介绍，他们在猴子身上曾经进行过大量的安全性试验。给试验猴用了很大剂量的BAX 499，整个试验持续了半年多，可当时并没有发现这种药不安全。

Scheiflinger等人认为，他们现在终于能够解释为什么在人体临床试验中出现了问题。在人体内，TFPI只能够存在几个小时，但是BAX 499的半衰期却要长得多。BAX 499与TFPI因子结合之后，就能够延长TFPI的半衰期，因此，TFPI就会在血液里积聚起来。而BAX 499又不能够完全抑制TFPI的活性，所以才会加大TFPI的作用，促使血友病患者继续出血。虽然这看起来只是BAX 499这一种药物的问题，但是百特制药公司却已经彻底放弃了核酸配体类药物的开发工作。

百特制药公司现在的研发目标是能够抑制TFPI因子作用的肽类药物（peptides），也就是Scheiflinger等人在2005年提出的策略。百特制药公司已经发现了多种比较有潜力的候选药物，不过还没有最终决定，是否为这些药物开展临床试验。



TFPI并不是制药公司锁定的唯一目标。美国马萨诸塞州的Alnylam制药公司就把目标瞄准了人体肝脏分泌的抗凝血因子——抗凝血酶（antithrombin）。据该公司临床研发部门的医学总监Benny Sorensen介绍，抗凝血酶可能是人体内最强力的天然抗凝血因子。Alnylam制药公司的策略不是抑制抗凝血酶的活性，而是利用RNAi技术抑制其表达。

Alnylam制药公司已经为这种名为ALN-AT3的新药进行了安全性测试，试验结果将于2015年5月在澳大利亚墨尔本举行的国际血友病联盟年会（World Federation of Haemophilia annual meeting in Melbourne,Australia）上公布。ALN-AT3试验选择的都是健康的志愿者，给这些志愿者注射了低剂量的ALN-AT3之后，抗凝血酶的表达量减少了28~32%。据Sorensen介绍，该实验结果让很多科研人员都大吃一惊，因为大家原本以为需要更大的用药量才能够达到这种抑制效果。

不过Sorensen相信他们还能够做到更好。在试验的第一阶段，出于安全性考虑，他们不能让健康志愿者体内抗凝血酶的表达量下降超过40%。不过到了试验的第二阶段，他们会接纳血友病患者参加试验，到时候就没有这种限制了，届时会进行多种剂量的试验。

Sorensen认为，如果他们能利用ALN-AT3药物将人体抗凝血酶的表达量下调50~80%，那么血友病患者将不再需要补充凝血因子，也能够防止出血。

谨慎的乐观

所有这些新型治疗药物与传统的凝血因子补充疗法相比，都有一大优势，那就是可以进行皮下注射。诺和诺德制药公司计划参照他们为糖尿病患者开发的胰岛素注射装置——诺和笔，也为concizumab开发一款“笔”式产品。这要比目前的凝血因子静脉给药方式方便得多。据Sorensen介绍，血友病患者经常会担心一个问题，那就是在他们生命的最后一、两年里，还怎么给自己进行静脉注射。如果我们能够解决这个问题，那么就真的给这些患者的生存质量带来了不可想象的改变。

如果concizumab和ALN-AT3这些新药的疗效得到了证实，那么毫无疑问，至少将给一部分血友病患者（即体内产生了抗凝血因子VIII和IX抗体的患者）带来福音，大约有5%的乙型血友病患者和30%的甲型血友病患者都会因此获益。诺和诺德制药公司、百特制药公司和Alnylam制药公司都认为，他们的新产品也会给其他的血友病患者提供帮助。不过这些新药在安全性和疗效方面存在是否可以完全替代现有的凝血因子产品的问题，Scheiflinger认为这是一个价值数百万美元的问题。Sorensen对此是最乐观的一个人。他认为，每月注射一次ALN-AT3完全能够替代凝血因子。即便血友病患者不能完全放弃凝血因子药物，使用ALN-AT3之后也能够极大地减少凝血因子的补充剂量和补充频率，这样一来，仍然可以减少产生抗凝血因子抗体的几率。

不过临床上很多血友病专科医生们却并不这么乐观。比如瑞典隆德大学（Lund University in Malmö, Sweden）的血友病专家Erik Berntorp就指出，血友病医生们都普遍认为，对于体内还不存在凝血因子抗体的血友病患者而言，这些新药不可能完全替代凝血因子。美国密歇根大学安娜堡分校（University ofMichigan, Ann Arbor）的遗传学家David Ginsburg也表达了同样的看法，他表示，对于遗传缺陷性疾病而言，除了补充缺失的因子以外，很难有其它更好的办法了。

Kenneth Mann是美国佛蒙特大学（University of Vermont in Burlington）的生化学家，他认为，抑制抗凝血途径之后肯定会增加凝血酶这种关键性凝血因子的产生，但是他认为这种新疗法并不一定适合所有人。他认为，血友病患者群体的异质性比我们想象的要高，我们只有根据这些患者自发性出血的几率对他们进行分层，然后有针对性地进行风险收益评估，才能够决定哪些患者使用抗凝血抑制剂药物之后能够获得临床获益。“我可不是要泼冷水，不过谨慎是应该的。” Mann这样说道。

使用这种抗凝血抑制剂药物有一个很大的风险，那就是药效太好以致会打破凝血调控平衡。据Ginsburg介绍，没有血友病的健康人如果缺少了抗凝血酶的作用，将会产生灾难性的后果。缺乏抗凝血酶或TFPI的小鼠在宫内就会死亡。虽然我们在治疗血友病时不会彻底抑制这些抗凝血因子的活性，但这还是存在一定的风险的。而且就像BAX 499一样，一款新药的风险是完全无法预估的。

Jakob Back是诺和诺德制药公司concizumab项目的负责人之一，他对这些担心也非常理解。血友病患者使用凝血因子补充治疗方案已经有几十年的经验了，而Concizumab这些抗凝血新药则采用了一种完全不同的新策略，所以前方还有很多未知的领域等待我们去探索和发现。

六、血友病关节损伤问题

血友病关节损伤（joint problems）是影响血友病（haemophilia）患者的主要慢性疾病，相关的诊疗措施正在研发之中。

Annette von Drygalski是美国加州大学圣地亚哥分校医学中心（University of California’s San Diego Medical Center）的一名大夫，她的患者主要是成年的血友病患者。在来找她看病的患者当中，有很多都是因为膝肘关节肿胀和疼痛而来的，主要的原因是患者的关节腔出血、积血。这种能够引起关节炎（arthritis），甚至让人致残的疾病的发病率近年来不断增加。因此，von Drygalski和她的科研团队启动了相关的研究工作，她们也是越来越多的致力于研究血友病关节疾病、以及由此引发的关节疼痛的众多科研团体中的一份子。

在凝血因子替代疗法大范围使用之前，血友病患者很少能活到成年阶段。所以血友病关节疾病也不太常见，因此并不是科研人员们关注的焦点。但是现在，血友病患者的存活寿命已经与正常人无异了，所以血友病关节病也逐渐成为了一种影响血友病患者生存质量的重要并发症。

关节腔内出血能够迅速引起关节僵硬（stiffness）和疼痛。从血液中沉积下来的铁离子会引发炎症反应（inflammation），导致滑膜炎（synovitis）。医生可以通过外科手术切除这些炎症组织（但这对于血友病患者又会带来进一步出血的风险），也可以在关节腔内注入放射性物质，进行局部放疗。这些放射性物质释放出的放射线可以杀死关节腔滑膜细胞，并阻止关节腔进一步出血。据美国加州大学洛杉矶分校（University of California, Los Angeles）专门开展血友病关节疾病手术的整形外科医生Mauricio Silva介绍，这些外科治疗手段都是非常精细的治疗措施。Silva医生指出，这些血友病关节疾病患者的病情要比其他关节炎患者严重得多。

关节腔出血患者的基本治疗手段是加大凝血因子治疗的用量。但是这样一来，治疗费用会增加很多，而且并不是所有人都会见效。所以，von Drygalski表示，除了凝血因子治疗手段之外，血友病关节疾病诊疗领域需要有更多的新进展，这样才能够在下一个十年里，更好地提高血友病患者的生存质量。

科研人员们正在从多个不同的角度入手，试图解决这个问题，比如有人在开发更好的影像诊断技术，有人在寻找新的、有助于发现关节腔微小出血的分子标志物，还有人在尝试用治疗其它关节炎疾病的方法来处置血友病关节疾病。所有这些研究工作都能够帮助我们找到血友病关节疾病的病因及发病机制，从而开发出新的诊治技术。

关节检查技术

在血友病关节疾病的诊疗工作当中，我们现在还没有一个明确的诊断标准，以区分患者究竟是属于普通的、关节炎导致的关节疼痛，还是因为关节腔出血才导致了关节疼痛。

Von Drygalski等人的研究表明，在伴关节疼痛的血友病患者当中，只有1/3的关节疼痛是与关节腔出血相关的。临床医生们也发现，他们很难判定关节疼痛的真正原因。比如von Drygalski等人开展的一项涉及40个病例的小型研究就发现，临床医生们通过对患者进行问诊和体格检查之后做出的诊断里，有18个诊断都是错误的。

核磁共振检查（magnetic resonance imaging, MRI）提供的高质量图像等影像学检查手段可以为临床医生们提供帮助。但是MRI检查速度慢、费用昂贵，而且对设备也有要求，不太方便，所以并没有在血友病的临床诊疗工作当中得到普遍的应用。

正是因为看到了这些不足，von Drygalski等人才开发了一种超声检查手段。这套骨骼肌肉超声检查系统（musculoskeletal ultrasound, MSKUS）使用了曲棍球杆一样的超声探头，该探头能够在患者感到关节疼痛时分辨出是关节腔出血还是关节腔炎症反应。辉瑞制药公司（Pfizer）出资在欧洲启动了一个大型的项目，该项目为10~15个血友病诊疗中心的医护人员提供培训，让他们掌握了这项超声检查新技术。他们还计划在美国开展同样的工作，该计划将为10个医疗中心提供培训服务。

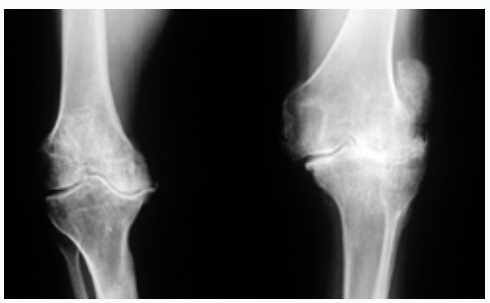
据von Drygalski介绍，她们开发的这套MSKUS系统能够对关节腔隙进行扫描，从而判定关节腔内是出血还是炎症反应，其诊断准确度与MRI检查一样，但是成本要低很多。而且这种超声检查手段还能够提供很多细节，帮助我们了解血友病患者关节内的急性病变和慢性病变情况，因为关节腔内出血既能够引起滑膜炎，同时也能够引起软组织炎症损伤。

TAFI分子的作用

目前，人们对血友病关节疼痛相关的分子机制还不是太了解。有一种理论认为，血友病患者的血液是作用比较弱的凝血酶激活的纤溶抑制物（thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, TAFI）活化因子。我们知道TAFI能够控制凝血块的稳定性，同时还具有抑制炎症的作用。比如，使用TAFI可以缓解由非血友病性的炎性关节炎（inflammatory arthritis）所导致的不适症状。由于TAFI因子能够抑制血凝块溶解，所以也对血友病患者的病情控制有所帮助。Von Drygalski与美国加利福尼亚州Scripps研究院（Scripps Research Institute in La Jolla, California）的分子医学副教授Laurent Mosnier合作，正在研究如何使用TAFI来解决血友病关节问题。

Mosnier的工作主要是开展分子机制方面的基础研究，以了解血凝块溶解在出血过程中的作用；他还会开展一些基因工程学方面的工作，研究是否可以对TAFI进行遗传学改造，增强其功效，以减少与出血相关的一系列并发症的发生几率。

为了研究TAFI因子在凝血及抗炎方面的具体作用机制，以及血友病患者TAFI因子作用不足的原因，Von Drygalski和Mosnier等人使用了血友病小鼠动物模型，以及*TAFI*基因缺失小鼠来开展科学研究工作。Von Drygalski希望通过她们的科研工作，能够开发出新的、不同于传统凝血因子补充疗法的血友病治疗方案。如果她们能够证明，血友病患者是因为TAFI因子作用不足才导致了关节问题和炎症问题，那么就应该开发出长效的、作用更强的人工TAFI因子。她们相信，这种因子将缓解，甚至能够预防血友病关节疾病。



这是一位血友病患者双侧膝关节的X光片，他两侧的膝关节都已经因为关节腔出血而发生了严重的损伤。

分子标志物

医生们最希望能够有一种方法可以让他们知道哪些血友病患者发生关节问题的几率最高。美国芝加哥Rush大学（Rush University in Chicago, Illinois）的分子生物学家Narine Hakobyan已经在血友病小鼠的血液当中发现了五、六种可以代表关节腔微量出血的分子标志物，它们可以让医生在关节发生严重损伤之前就提前发现问题。

Hakobyan与她的同事Leonard Valentino（他目前就职于百特公司）从2001年开始着手从事血友病关节病变动物模型的建造工作。最终培育出了一种在受伤之后会出现关节出血的小鼠动物模型，以及另外一种哪怕在没受伤时也会发生关节出血的小鼠动物模型。他们还建立了一套评分系统，来评价药物对关节腔出血的止血功效，这些工作都有助于我们开发出治疗血友病关节疾病的新药。

Hakobyan也发现了一些分子标志物，在血友病动物模型小鼠的关节腔内哪怕只注入25微升的血液，这些分子标志物的水平也会发生变化，所以这些分子标志物对于血友病关节疾病具备预测功能。这些分子标志物还可以帮助科研人员寻找治疗血友病关节疾病的新药，同时能够揭示血友病关节疾病背后的分子机制。Hakobyan认为，这些分子标志物有助于我们发现血友病关节疾病在哪个阶段以前是可以逆转的，以及告诉我们可以针对哪些靶点进行治疗。当然，我们也可以发现与血友病关节疾病其它病情进展阶段相关的分子标志物。

补充凝血因子之外的其它治疗手段

为了更好地了解关节，以及关节在出血之后的反应，科研人员们对与此相关的骨改变也做了研究。美国北卡罗来纳大学教堂山分校（University of North Carolina in Chapel Hill）的血友病专家Paul Monahan认为，这可能需要运用创造性思维，思考除了凝血机制以外还存在哪些作用机制才行。Monahan就一直在研究是否可以运用治疗类风湿性关节炎（rheumatoid arthritis）的药物来抑制血友病小鼠动物模型的关节炎症，并改善其关节的活动性。

Monahan认为，用补充凝血因子这种预防性治疗措施来治疗所有的血友病患者（尤其是那些在两次凝血因子注射期间会发生出血事件的患者）并不是一个明智的选择。比如，之前的研究就发现，在血友病患者中间，只有不到40%的人会接受超出用于预防关节腔出血初级预防标准剂量的凝血因子注射治疗。

Monahan将此比作只用一种药物来控制哮喘的治疗方案。他指出，你不会只用支气管扩张药物来治疗哮喘患者。你肯定会同时解决喘息急性发作问题和慢性炎症反应问题。所以血友病患者也应该同时解决凝血问题和炎症反应问题。

另外一种治疗策略是使用放疗手段破坏炎性关节腔滑膜细胞。美国俄亥俄州的Navidea生物制药公司（Navidea Biopharmaceuticals of Dublin, Ohio）于2014年7月宣布，他们将与新兴的Rheumco公司合作，开发一种能够破坏关节炎性组织的小型放疗新技术。他们的方案是在血友病患儿的关节腔内注入一种胶状的锡[117]同位素颗粒悬液。之所以选择这种同位素，是因为这样可以只对非常小范围内的局部组织进行放射线照射，从而不会“误伤”邻近的组织，这对于骨骼还处在生长发育阶段的儿童来说非常重要。

Navidea公司和Rheumco公司已经完成了动物实验工作，目前正在对该技术进行优化，希望早日开展人体临床实验。Navidea公司的前任CEO，现在在美国纽约Agilis生物治疗公司（Agilis Biotherapeutics in New York）担任CEO的Mark Pykett认为，用这种新技术来治疗血友病关节疾病患儿如果取得成功，那将是一个极大的突破，因为血友病关节疾病能否得到早期治疗才是关键。已经有医生发现了年仅2岁的血友病关节腔出血患儿。所以Pykett认为，你只有及早进行预防，这些孩子才能在十年，或者二十年之后有一个更好的预后。

血友病关节疾病还缺乏有效治疗手段的现状让更多的科研人员投入到相关的研究工作当中。就在几十年以前，血友病患儿还是无法活到成年的，可现在，他们已经可以带病生存几十年了。von Drygalski认为，关节问题是非常重要的，因为血友病患者已经能够活到六、七十岁，甚至更大的年纪了，他们现在更需要的是像健康人一样活着。

百态·频道

www.LifeOmics.com

七、血友病最佳动物模型——狗

在血友病的研究上，人类的确有个好朋友。

北卡罗来纳大学（University of North Carolina）血液研究实验室里患有血友病的狗帮助研究者们深入理解该疾病，研发新的治疗方法。

Austin是一只黑白相间的英国牧羊犬。四年前，它的主人给北卡罗来纳大学（University of North Carolina）弗朗西斯•欧文血液研究实验室打电话的时候，Austin还是只幼犬。那时，父母们认为孩子们已经长大了，可以照顾一条狗了。他们迅速办好了相关手续，带Austin回家。但不到六个月，他们发现Austin会因为一点小的刮伤而流血不止，主人付给兽医的治疗费用已经超过了1万美金。Austin的关节处会发生自发性流血，过于兴奋时也会发生不可控的流鼻血。主人一家非常爱Austin，但实在无法继续照顾Austin。

北卡罗来纳大学血液研究实验室主任Timothy Nichols一年会进行4到5次的血友病狗咨询。有时候他会为家庭提供建议和信息。另一些时候，他会把这些血友病狗带回实验室。血液测试证实Austin患有血友病，Nichol实验室的两位同事乘坐飞机到新奥尔良，租了辆车，把Austin放在充满麻醉药的清凉的盒子里，带回教堂山。在这里，Austin加入到了众多血友病狗之中，成为科学家们的研究对象。值得一提的是，这个实验室自70年前就已成立。

对于很多其它疾病来说，大鼠是常用的动物模型，但血友病的最佳动物模型却是狗。狗会天然发生血友病，又有充足的血液以供研究，而且寿命足够长，便于观测治疗的长期效果。

血友病狗的研究历史

记录在册的第一例血友病狗发生于与苏格兰相近的三个地区。大约10年后，纽约一名律师的两条爱尔兰雪达犬经常流血，包括外出血和内出血，为此他联系了北卡罗来纳血液研究实验室。当时北卡罗莱纳血液实验室非常想要获得血友病动物模型，当时的实验室主人Kenneth Brinkhous领养了这两条长毛狗，然后为这两条狗配种。此后，加拿大金斯顿的皇后大学（Queen’s University）、英国伯明翰的阿拉巴马大学（University of Alabama）和日本的奈良大学（Nara University）就有了血友病狗基地。纽约的康奈尔大学（Cornell University）也有一些血友病狗。如今，这些基地既有血友病狗，又有健康狗，以便维持种群中携带不同血友病变异型的狗。

很快血友病狗就成为了研究人类血友病的核心模型：血友病在狗和人身上的发病机制是相同的。例如，20世纪40年代的早期配种工作证实，引起狗的血友病基因位于X染色体上——后来的研究证实，人的血友病基因也位于X染色体上。除了极少情况，只有男性会患血友病，而女性只是携带者。加州圣莫妮卡的兽医Jean Dodds自1959年就开始治疗血友病狗，她表示，血友病狗的基因和实验室研究以

及血液测试证实，人和动物拥有一些共同的基因缺陷。

最近，基因测序研究表明，人和狗的体内造成血友病的基因突变是完全相同的。人和狗所患的血友病都能分成A型和B型血友病，这两种类型分别由编码凝血蛋白因子VIII和IX的基因上的缺陷引起。人和狗所患的血友病发病症状非常类似：凝血有困难，因此一点小伤口都使得流血无法控制。肠道流血能引起腹泻。同时关节和肌肉处容易发生内出血。

另外，狗也是非常实用的模型。大部分狗比小孩子的个子要大，对药物的反应和人类似。这样研究者们在计算剂量的时候，可以先对狗做实验。而且，狗非常配合。Nicholds指出，狗一天到晚围着人转，非常配合。比如，如果你想抽血，狗会主动把爪子伸出来。

重要成果

血友病狗基地的狗非常受研究者的青睐。阿拉巴马大学（University of Alabama）的兽医Clint Lothrop从基地里领养了几只狗。当这些狗出血时，他会在家里治疗它们。皇后大学（Queen’s University）的血友病学者David Lillicrap表示，每天下午这些狗开始玩耍，它们奔跑、攀爬、玩球和其它玩具。北卡罗莱纳大学的血友病狗还拥有一个户外娱乐场。严重的血友病狗很容易出血，因此看护者必须确保这些狗不会打架，不进行剧烈运动。玩耍之余，研究者们会从狗身上抽血。科学家们利用这些血液发现了血友病发生、发展的诸多机制。

到20世纪50年代，研究者们就知道正常的血液能够缓解凝血问题，但他们不知道血液中的哪种成分具有凝血作用。在患血友病的狗血液的帮助下，Brinkhous等人推测，凝血因子存在于血浆中，而非血小板和红细胞中。血友病狗接受健康血浆后，病情有所改善。当科学家们鉴别出了凝血因子VIII和IX，并能准确区分健康狗和血友病狗后，Brinkhous等人提出了基于血液在试管中凝固所需的时间，来检测血浆中这两种凝血因子含量的方法。

Nichols表示，在20世纪40年代，血友病患者的平均寿命为20年，并且饱受关节、肌肉内出血等问题的折磨。20世纪60年代中期提出的血浆替换治疗能有效提高血液中凝血因子的水平，从而改善病人的生活质量，延长他们的寿命。

在20世纪70年代和80年代早期，血友病治疗经历了一段黑暗时期：由于部分献血者携带HIV病毒或乙肝病毒，导致这些接受血浆替换治疗的患者不幸感染这些疾病。这一次，又是狗帮助人类走出了这一段黑暗时期。

1984年，当通过凝血因子VIII的基因克隆能实现在实验室条件下合成凝血因子时，科学家们认为黎明的曙光近在眼前。但多年来血液携带传染病的阴影，以及人们对于基因改造产物的畏惧让人们怯于尝试这种人造凝血因子。之后，以狗为动物模型的研究表明，这种疗法不会带来并发症。一名43岁的北卡罗莱纳立法官GM （代号）同意成为第一个接受该治疗的患者。Nichols表示，他了解过Brinkhous的研究，也了解过教堂山的那些血友病狗，因此他知道这个疗法非常有效，而且很安全。

让所有人都松了一口气的是，这次手术非常成功。事实上，注射凝血因子非常简单，这个过程里，GM还开玩笑地把自己伪装成一只仓鼠（凝血因子是在仓鼠细胞里合成的）。当这种疗法终于经过许可后，GM在麻省剑桥的遗传学研究所（Genetics Institute）的庆祝会上作了发言。关于这次发言，威斯康星州血液中心（Blood Center of Wisconsin）血液研究院（Blood Research Institute）的主任Gilbert White在其回顾35年来血友病研究进展的论文中这样写到，“当GM缓慢痛苦地爬上楼梯到达露台后，他讲述了自己作为一名血友病患者，在缺乏合适治疗情况下的痛苦经历。他的哥哥也是血友病患者，死于出血。他强调了安全的人造凝血因子对包括他在内的所有血友病患者的重要性。这场发言之后，全场的听众都热泪盈眶。”

指明方向

在狗身上的研究往往提示着人类血友病研究将会迎来的新进展。如今，超过25种在狗上测试的血友病治疗产品通过了许可，可用于人类临床。最早的研究之一是1993年发表的基因治疗的可行性。该研究以三只缺乏凝血因子IX的狗为模型，使用了极度有创的手术——切除了每只狗三分之二的肝脏。在之后的三天，研究者们将一种可能有害的、装载了正常基因的HIV样的病毒注入这几只狗的正在修复的肝脏中。这三只狗只血液中的凝血因子IX从0增加到正常水平的1%——这让人们相信将来可能利用这种治疗来治疗血友病。

到了1999年，在狗身上的研究表明，注射另一种更加安全的载体——腺病毒能递送健康的凝血因子IX基因，把凝血因子IX的浓度从0增加到正常水平的2%——这个水平能有效减少自发性出血。宾夕法尼亚大学（University of Pennsylvania）佩雷尔曼医学院（Perelman School of Medicine ）的血友病学者Katherine High表示，后来这方面的进展非常快，能把凝血因子IX的水平增加到10%，并且能在很长一段时间内维持在这个水平。现在，狗仅需要接受10-15分钟的注射（携带了凝血因子基因的病毒），就能有效改善病情。Nichols指出，凝血因子VIII的类似研究成果也非常喜人。

部分第一批接受一次凝血因子IX基因注射治疗的狗过着充实又快乐的生活。Brad和Semi是两条巴辛吉犬——一种非洲猎犬，它们住在阿拉巴马大学的血友病狗基地。接受基因治疗后，两只狗分别死于13岁和14岁——死因都与血友病无关。几个评估凝血因子IX基因治疗在人体上的效果的临床试验正在进行中。

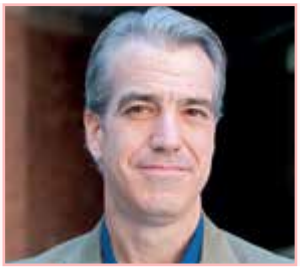
目前有其他研究正在测试口服凝血因子VIII和IX的有效性，这一方法用于小鼠已被证实有效。目前用于狗正进行进一步验证。Lothrop等人现在的研究表明，皮下注射比非静脉注射的效果更持久、更微创。

接受凝血因子替代治疗的患者往往会产生抗体，降低身体对凝血因子的响应。为此科学家们以狗为模型，研究治疗策略。一种方法是向狗体内注入凝血因子VIIa的基因，从而完全不需要凝血因子VIII和IX。这个疗法能把自发性出血从一年5到10次降低到一年1次甚至0次。

其他的研究中，狗接受骨髓移植，从而在血小板中表达凝血因子VIII，躲过抗体的抑制作用。Nichols的团队获得了缺乏凝血因子VII基因的狗，从而可以研究一些在人类中极为罕见的、难以获得足够临床数据的出血性疾病。

如果没有狗模型，这些最新的治疗策略都不可能实现。Lillicrap表示，过去三十年里，血友病狗在血友病新疗法的临床前研究中发挥了巨大的作用。他还指出，血友病一度被认为是无法战胜的，但由于有了狗的帮助，攻克血友病指日可待。在未来的几十年里，狗仍将在这一领域发挥重要作用。

八、观点：治疗血友病的新希望



Stephen Pemberton（左图）指出，历史将会向我们揭示，为什么血友病患者和他们的医生们对于有可能治愈血友病这一观点一直持比较谨慎的态度。

2011年，《新英格兰医学杂志》（*New England Journal of Medicine*）上发表了一篇意义重大的研究，该研究详细地介绍了6名成年乙型血友病患者被成功治好的经历。乙型血友病是因为体内缺乏凝血因子IX而导致的一种疾病。所有参与这次实验的患者都减少外源凝血因子注射的频率，甚至是停止了凝血因子补充治疗（这是目前治疗血友病的常规治疗方案），因为他们的肝脏开始合成出有功能的凝血因子IX。这次实验采用的是以腺相关病毒（adeno-associated virus, AAV）为载体的基因治疗技术。科研人员们在腺相关病毒载体上置入了能够在人体内表达出正常人体水平凝血因子IX的编码基因。目前还有3个同类的研究项目正在进行之中，大家都对实验结果报以了很高的期望。

基因治疗技术经过了20多年的发展，目前已经到了能够使用这种技术治疗血友病的时期。现在看来，在十到二十年之内，我们将极有可能只用一次腺相关病毒或其它基因载体注射就能治好很多乙型血友病患者。

但从事血友病研究的科研人员们还不太敢说他们能够“治愈”血友病。这是因为还存在一些问题没有得到解决。比如有40%的乙型血友病患者用这种疗法进行治疗就得不到任何治疗效果，因为他们自身的免疫系统会产生针对腺相关病毒载体的抗体，所以很快就会彻底消灭体内的这些病毒载体。

即便这个问题得到了解决，我们也只能够用这种疗法治疗乙型血友病患者。而更常见的却是缺乏凝血因子VIII的甲型血友病患者，我们现在还没有找到相应的编码基因。而且不管是治疗哪种血友病，还有一个困扰了我们几十年的问题没能得到解决，那就是与基因治疗技术相关的伦理道德问题。

最初，大家都对基因治疗技术无比乐观。但随着1999年，18岁的Jesse Gelsinger在参加美国宾夕法尼亚大学（University of Pennsylvania in Philadelphia）开展的一项1期临床实验之后不幸死亡，这一切都改变了。Gelsinger患有先天性鸟氨酸转移酶缺乏症这种代谢性疾病，这种疾病本来是可以通过药物治疗或低蛋白饮食进行控制的，但他却在这次基因治疗实验中不幸死亡了。这次事件，以及其他几起在治疗其他疾病的早期基因治疗实验中发生的严重有害事件，让整个基因治疗研究领域都警醒了。

与同时代那些自称为基因大夫（gene doctors）的人相比，曾经参与过基因治疗的血友病专家们对于基因治疗技术要显得更加谨慎。他们的这种谨慎并非源自1999年之后基因治疗界持有的那种审慎的乐观态度，而是源自血友病研究界长期以来经历过的，各种新技术进展给他们带来的希望与失望交替的痛苦经验。

在上世纪七十年代末，一种新技术革命彻

底改变了血友病治疗的现状，使血友病从一种让人没有太多办法的遗传性疾病变成了一种完全可以受到很好控制的疾病。这就是血液制品补充疗法，但是这种辉煌只持续了很短的一段时间。虽然这种治疗能够让血友病患者获得一定程度的正常生活，但同时也给他们带来了一场意想不到的大灾难。在上世纪八十年代，有数十万名血友病患者被查出感染了HIV病毒；到上世纪九十年代，又有很多血友病患者被查出感染了丙型肝炎病毒（hepatitis C virus, HCV），这都是因为输血而造成的。

这些恐怖的记忆还时常出现在曾经、以及正在从事血友病相关工作的人员的脑海，再加上Gelsinger的死，以及什么时候才应该对儿童进行腺相关病毒基因治疗实验等伦理学问题的困扰，所以大家认为，至少在目前看来，用基因治疗技术来治疗血友病还不是一个最好的选择。而且生物制药公司也开发出了用于治疗血友病的长效凝血因子产品。

这种一劳永逸式的治疗手段给我们带来的诱惑也引起了一种历史性的担忧。在上世纪八十年代，虽然大家都知道，使用凝血因子浓缩物存在很高的病毒感染风险，但是由于这种治疗方案比较方便，所以还是有很多医生和血友病患者继续使用这种药物，而没有选择更加安全，但是比较麻烦的、传统的血浆治疗。正是这种图方便的心理，让数万名血友病患者染上了HIV和HCV病毒。

此外，我们也很难让世界上那么多（占所有血友病患者绝大多数）生活在不发达国家里的血友病患者用上凝血因子治疗这种昂贵的治疗手段。目前大约有75%的血友病患者还没有获得足够的治疗，这种情况在凝血因子药物供应有限的欠发达国家显得更加突出。而基因治疗可能会让他们第一次拥有完全控制好病情的机会。

历史告诉我们，凡事都不会只有一条解决途径，这要取决于相应的环境，情况是非常复杂的。比如发达国家里的血友病患者的需求肯定和低收入国家里的血友病患者不一样。但是社会正义要求我们，应该给所有人同样的治疗机会。过去的输血感染事件告诉我们，让医生、患者、制药公司、公共卫生管理部门等各方全都参与进来，对各种治疗方案进行综合评估是非常重要的。如果我们能够在上世纪七、八十年代发现输血能够传播HBV病毒之后就这么做（将各方集中起来进行讨论），那么就不会再发生后来的HIV和HCV感染事件了。

原文检索：

Neil Savage. (2014) BORN IN THE BLOOD. *Nature*, 515: s158-s159.
Julie Gould. (2014) Genie in a vector. *Nature*, 515:s160-s161.
Neil Savage. (2014) Stretching time. *Nature*, 515:s162-s164.
Elie Dolgin. (2015) Oral solutions. *Nature*, 515:s166-s167.
Cassandra Willyard. (2014) Balancing act. *Nature*,515: s168-s169.
Katharine Gammon. (2014) Joint effort. *Nature*, 515:s170-s171.
Emily Sohn. (2014) Dogged pursuit. *Nature*, 515(1038): S172－173.
Stephen Pemberton. (2014) The fix is in. *Nature*, 515:s165.

Eason、张洁/编译

GeneCopoeia™
Expressway to Discovery

基因功能研究专家

EZShuttle™

重 组 克 隆 体 系

- 原理和 Gateway® 克隆技术相同

GeneCopoeia 提供的 **EZShuttle ™ 重组克隆体系**应用重组酶促体系使 DNA 片段在载体间相互转换，无需酶切、电泳、割胶和 DNA 片段纯化等繁琐操作。EZShuttle ™ 重组克隆体系。

包含以下产品：

EZRecombinase ™ LR Mix （20 次反应 / 100 次反应）

- 高效率酶 —— EZRecombinase ™ LR Mix 的活性优于 Gateway® LR Clonase ™；
- 与 Gateway® 克隆技术完全兼容；

EZShuttle ™ Gateway® PLUS 穿梭克隆

- 30,000 多种人、小鼠全长编码基因；
- 所有 ORF 全长测序确证；
- 终止密码子可选；
- 带有 attL 重组位点，与 pEZ ™ 表达载体相匹配；
- 转换载体后无需再次测序；

pEZ ™ 表达载体

- 多种宿主可选：大肠杆菌、慢病毒、哺乳动物细胞和植物细胞；
- 多种不同类型的启动子、筛选标记和标签蛋白可选；

新产品促销！

☎咨询热线：4006-020-200

	Enzyme compatibility		Cloning vector compatibility		Shuttle clone compatibility		
	EZRecombinase™ LR Mix (GeneCopoeia)	LR Clonase™ (Gateway®)	pEZ™ (GeneCOPOEIA)	pDEST (Gateway®)	EZShuttle™ Gateway® PLUS ORF clones	ORFeome clones	Entry clones (Gateway®)
EZRecombinase™ LR Mix			√	√	√	√	√
pEZ™ cloning vectors	√	√			√	√	√
EZShuttle™ Gateway®PLUS ORF clones	√	√	√	√			

表 1. GeneCopoeia 的 EZShuttle ™ 重组克隆体系（左列）与 Gateway® 克隆技术完全兼容。

注：Gateway® 是 Invitrogen 的注册商标。

Tel：4006-020-200 / 020-32068595　　Email：sales@igenebio.com　　Web：www.igenebio.com

热点

Hot Topics

肠道菌群与大脑发育

科学家们利用最前沿的技术来破译人体免疫之谜。

将近一年前，Rebecca Knickmeyer与她的大脑发育研究项目中的第一位参与者见了面。Knickmeyer是北卡罗来纳大学教堂山分校医学院（North Carolina School of Medicine）的神经科学家。她希望通过行为记录和性格测试来记录30名新生儿的成长历程。一项测试中，宝宝的妈妈会离开房间，然后与一位陌生人一起重新出现。如果实验顺利，宝宝睡着后，实验人员会用磁共振成像仪器来扫描宝宝的大脑。

Knickmeyer表示，他们考虑了各种情况，希望能发现宝宝大脑发育的秘密。

Knickmeyer非常期待能从宝宝身上获得更多信息——包括宝宝粪便里的微生物、细菌及病毒等。除了Knickmeyer的研究项目（被

亲切地称为“便便研究”），越来越多的神经科学家也在研究大脑发育与肠道菌群之间的联系。

Knickmeyer的研究已进入关键阶段。越来越多的数据（其中大部分来自于在无菌环境下饲养的动物）显示肠道菌群能影响行为，并能够改变大脑生理和神经化学。

这方面的人体研究相对有限。科学家们已发现肠道疾病与诸多精神神经疾病，包括焦虑、抑郁、自闭、精神分裂和神经退行性疾病等有关联，但具体细节仍是未知。

加利福利亚大学圣地亚哥分校（University of California, San Diego）的微生物学家Rob Knight指出，一般来说，微生物领域的一个大问题是因果性。你很难说，肠道菌群的差异到底是疾病的因还是果。已有一些研究开始解密肠道菌群与大脑互动的机制，但科学家们对这种互动机制到底在大脑发育和生理中起到了什么样的作用仍毫无头绪。

理论的缺乏并不能阻止保健品公司通过益生菌获利。他们声称，在保健品中添加据称能够促进消化的益生菌，能促进情绪健康。一些在神经疾病药物研发领域停滞不前的制药公司也开始在肠道菌群及其代谢产物分子研究领域投资。

科学家和基金机构都希望能揭开肠道菌群与大脑发育联系的谜题。过去两年里，美国国立健身健康研究所（National Institute of Mental Health, NIMH）资助了7个试点研究，每个项目的资助资金高达100万美金，这些项目都围绕“微生物-肠道-大脑”轴展开。Knickmeyer的项目就是其中之一。今年，美国海军研究办公室（US Office of Naval Research）也同意投入5200万美金用于研究肠道菌群在认知功能和应激响应中的作用。同时，欧盟投入1010万美金展开了一个为时5年的名为MyNewGut的研究项目。该项目的两大目标是寻找肠道菌群在大脑发育和疾病中的作用。

最新的研究打算在基础研究和相关性分析的基础上，寻找一些机制。研究者们发现，肠道菌群能通过多种机制，包括荷尔蒙、免疫分子以及特定代谢产物来影响大脑。

对于这些学说，Knickmeyer表示，猜测居多，可靠的数据相对较少。这个领域的研究方法缺乏金标准，这一点值得同仁们深入研究。

肠道反应

正常情况下，大脑中存在血脑屏障，能够阻断细菌和生物大分子进入大脑的路径，从而防止脑部感染和炎症的发生。因此，科学家们很少会把肠道菌群和大脑联系起来。一旦病原物通过了血脑屏障，则会造成严重后果，例如狂犬病病毒进入大脑后，患者会出现怕水，高度兴奋等症状。几十年来，科学家们对人体内的细菌种类了解甚少，肠道菌群影响大脑的理论更是一直不为主流医学所接受。但现在情况正在逐渐发生改变。

菌群爆发的研究是揭示这种关联的关键。2000年，加拿大一个名为Walkerton的小镇发生洪水，饮用水因此被大肠杆菌（*Escherichia coli*）和空肠弯曲菌（*Campylobacter jejuni*）等病原物污染。大约2300人发生了重度肠胃感染，很多人因此患上慢性肠易激综合症（chronic irritable bowel syndrome, IBS）。

经过对Walkerton小镇居民的8年随访，麦克马斯特大学（McMaster University）的胃肠病理学家 Stephen Collins等人发现抑郁和焦虑等心理问题似乎是慢性肠易激综合征的风险因素。Collins的同事Premysl Bercik表示，这种关系又引发了一个新问题——抑郁症等心

理问题会不会是长期炎症或某种细菌诱发的呢？

Collins等人开始用小鼠模型来寻找答案。2011年的一项研究中，他们把不同品系的小鼠进行肠道菌群交换。结果显示，将A品系小鼠的菌群移植到B品系的小鼠后，B品系小鼠表现出了一些原本为A品系小鼠特有的行为。Bercik举了个例子，原本“相对害羞”的小鼠接受了来自更爱冒险的小鼠的菌群后，会表现出更多的探索行为。“这很让人惊讶。细菌真的会影响宿主的行为。”尚未发表的研究表明，将来自肠易激综合征患者和焦虑患者的细菌移植到小鼠体内后，这些小鼠也会出现焦虑行为，而对照组（接受来自正常人的菌群）则不会出现这种症状。

这些研究都遭到了质疑。Knight表示，随着领域的发展，微生物学家必须向行为学家取经，毕竟饲养、操作手法的不同都会影响小鼠的社会地位、压力，甚至是菌群。

这类实验一般都是用的非天然的无菌小鼠。这些动物的出生都是通过剖腹产，防止出生时被母体阴道细菌污染。然后在无菌环境中饲养，食用经过高压蒸汽灭菌的食物，呼吸经过过滤的无菌空气。

2011年，瑞典卡罗林斯卡学院（Karolinska Institute）的免疫学家Sven Pettersson和神经科学家Rochelys Diaz Heijtz 发现，与正常小鼠相比，无菌鼠不易出现焦虑行为。（从进化的角度来看，老鼠作为一个拥有众多天敌的小型哺乳动物，更少的焦虑行为不是好事。）

Pettersson等人进一步分析了小鼠的脑部，他们发现，无菌鼠的纹状体中与焦虑相关的、包括5-羟色胺在内的关键性神经化学分子水平更高。该研究也表明，把这些成年无菌鼠换到正常环境中饲养也不能增加这些小鼠的焦虑行为。但这些成年后转入有菌环境的无菌鼠的后代的行为恢复了正常。这提示着，细菌对大脑发育的影响存在关键的窗口期，这段时期，细菌对大脑发育的影响最强烈。

随着数据的不断增加，越来越多的科学家对此非常感兴趣。但大部分研究都是来自于神经科学以外的领域。加州大学戴维斯分校（University of California, Davis）的生理学家Melanie Gareau表示，细菌对行为的影响的研究者大多是微生物学家和少数心理学家，因此研究成果都主要是描述周边系统和行为的变化，而非中枢神经系统的变化。

但Pettersson的团队改变了这一现状，他们把这一领域从观察现象推进到研究影响大脑的机制。美国国立健身健康研究所的Nancy Desmond表示，Pettersson等人的论文一经发表，很快引起了资助机构的兴趣。2013年，美国国立健身健康研究所形成了一个寻找神经疾病发病机制和研发药物或无创治疗的研究部门。

俄勒冈大学（University of Oregon）的神经科学家Judith Eisen获得了研究无菌斑马鱼的基金。斑马鱼的胚胎是透明的，便于科学家们观察发育中的大脑。Eisen表示，尽管无菌是一种非天然环境，但无菌斑马鱼能够帮助科学家们发现哪种微生物作用能对任一特定器官或细胞发育发生影响。

化学探索

同时，研究者们开始寻找肠道细菌向大脑释放信号的机制。Pettersson等人发现在成年鼠中，细菌代谢物能影响血脑屏障的基本生理功能。肠道菌群能把复杂的糖类降解成短链脂肪酸，从而发挥多种作用：例如，丁盐酸能通过增强细胞间的联系，加固血脑屏障。

近期的研究也证实了肠道菌群能直接影响神经递质的水平，从而可能以此来实现与神经

元的沟通。例如，加州大学洛杉矶分校的生物学家Elaine Hsiao今年发表了一篇论文，揭示了肠道菌群的特定代谢产物能够促进结肠细胞中5-羟色胺的合成的机制。这一结论非常有意思，因为一些抗抑郁药物的作用机制是促进神经元连接处的5-羟色胺分泌。小鼠体内60%、人体内超过90%的周边5-羟色胺由肠道内分泌细胞合成。

与Pettersson的团队一样，Hsiao也发现无菌鼠血液中5-羟色胺浓度明显较低。她也证实了，通过向无菌鼠接种产芽孢菌（主要是能够降解短链脂肪酸的梭菌）能够恢复5-羟色胺水平。相反，正常小鼠在使用抗生素后，5-羟色胺水平下降。Hsiao表示，至少在这些实验中，细菌和5-羟色胺合成之间存在因果关系。

但肠道内的5-羟色胺水平是否能引起一系列分子事件级联，进而影响大脑活动仍不明确。同样不明确的是，这个现象是否也存在于人体中。Hsiao指出，在人体上重复之前的研究非常重要，把这些理论转化成临床治疗手段具有重要意义，足以写进教科书。

爱尔兰考克大学（University College Cork）的神经科学家John Cryan正致力于此。他的实验室证实了，相比于正常小鼠，成年无菌小鼠在特定脑区的神经元更多。他正致力于促进神经科学家、心理疾病药物研究者和公众参与到肠道-大脑轴的研究中。他表示，纵览去年一年的神经科学论文，你会发现，神经科学家们付出终生努力来研究的基本生理过程都受微生物调控，例如血脑屏障的调控、神经形成，以及小胶质细胞（大脑和脊椎中的类免疫细胞）的激活。

本月的2015年神经科学学会（Society for Neuroscience）年会上，Cryan等人计划展示肠道菌群能影响髓鞘形成的研究。其他人的研究也表明，在相同的诱发条件下，无菌小鼠发生硬化症（以神经纤维的髓鞘脱失为主要特征）的概率更低。至少有一家公司，Symbiotix Biotherapies已经开始投资以肠道细菌的某种代谢产物来治疗硬化症的研究。

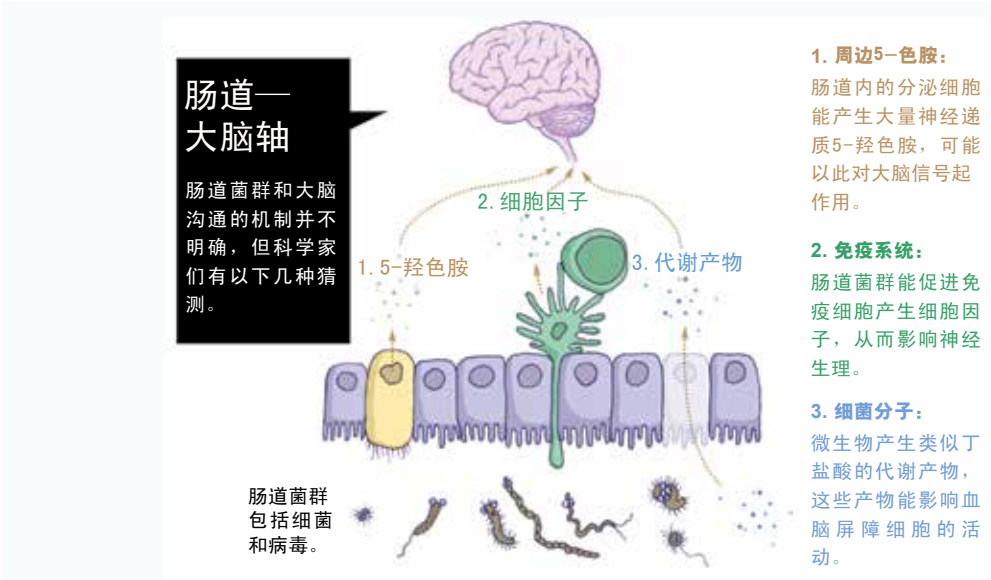
一切为了临床

宾夕法尼亚大学（University of Pennsylvania）的神经科学家Tracy Bale认为，或许简单的人工干预已经能够实现。3年前，Bale在研究胎盘时，了解到了Cryan的研究工作。她因此考虑把微生物引入到研究母体压力对后代的影响的模型中。

今年发表的研究中，Bale让怀孕的小鼠接触能诱发压力的刺激物。她发现，母鼠阴道中乳酸杆菌（幼鼠肠道内的主要细菌）明显减少。自然出生的幼鼠肠道内的乳酸杆菌也随之减少。Bale发现细菌能影响幼鼠脑发育，尤其是雄鼠。

Bale计划在神经科学学会年会上展示的工作如下：为剖腹产的幼鼠接种压抑小鼠的阴道细菌，这些幼鼠也会出现一样的神经发育变化。Bale等人如今正在研究能否通过为压抑的母亲产下的幼鼠接种非压抑的母鼠的阴道细菌来改善这些小鼠的神经发育的问题。

Bale表示，这项工作有即时转化意义。她指出，纽约大学医学院的微生物学家Maria Dominguez-Bello（New York University School of Medicine）的一个项目中，使用沾染产妇阴道细菌的棉布擦拭剖腹产的婴儿的嘴和皮肤。这一研究的目的在于，检测这样处理过的宝宝和顺产的宝宝携带的细菌是否一致。Bale表示，现在这还不是标准护理，但是Bale打赌，它肯定会成为标准护理。



对于微生物和行为之间的关联，以及微生物对人体健康的影响，很多人仍持怀疑态度。但科学家们似乎对此充满信心。例如，2007年，现任美国国立卫生研究院主任的Francis Collins提出人类微生物群系项目（一个大规模研究人体体内细菌的项目）可能有助于解决精神疾病。Collins表示，一些科学家对此非常有信心，因为越来越多的证据都表明了这一点。

资助机构也积极支持这一免疫、微生物学、神经科学交叉的领域。美国国立精神健康研究所已经提供了种子投资，支持动物模型和人体的研究，以调查这个领域是否值得更多的投资。这一举动鼓励了很多研究者投入到该领域的研究中。欧洲的MyNewGut项目对此类研究的态度更加乐观，尤其是对于研发能够改善大脑相关疾病的膳食建议。

今天，Knickmeyer以婴儿为模型的项目采用的是典型的广泛取样。在Knickmeyer扫描的脑区里，她对杏仁核和前额皮质最感兴趣——在啮齿类动物模型上，这两个区域都受到了微生物操控的影响。但把这些数据和其它数据整合在一起是个巨大的挑战。“关键问题是你如何考虑这些混合因素。”儿童的饮食、家庭条件和其它环境因素都会影响宝宝的菌群和神经发育，所以这些条件都需要区分开。

Knickmeyer认为，以肠道菌群为靶标来治疗精神疾病可能会因为其它原因而失败。例如，微生物与基因组的相互作用。即使科学家们能发现治疗用的最佳菌群组合，某些基因的病人体质可能更易促进某些细菌的生长，因此他们将无法从这类治疗中获益。因此需要研究的问题还很多。她还表示，这个领域非常开放，会有很多让人惊讶的东西，就像是西大荒（美国初期西部探险）探索一样。

原文检索：

Peter Andrey Smith. (2015) Brain, meet gut. *Nature*, 526(1038): 312-314.

张洁/编译

快快到你手！
慢慢陪你走！

GeneCopoeia™
Expressway to Discovery

GeneCopoeia慢病毒 销魂促销！

纯化级过表达慢病毒 *15% OFF*

活动时间：2015年10月19日-2015年12月31日

- **滴度 ≥ 1×10^8 TU/mL**
- 针对部分克隆，免收克隆构建费用；
- 实验周期低至15-20个工作日；
- 小量分装（25或50 μL/管），可避免多次冻融；
- 慢病毒颗粒均为纯化级别，可上活体。

描述	滴度	规格	病毒总量
过表达慢病毒	≥ 1×10^8 TU/mL	400 ul (50 μL/管)	0.4×10^8 TU
		1 mL (50 μL/管)	1×10^8 TU

（部分产品滴度≥2×10^5 TU/mL）

除了ORF 过表达慢病毒外，GeneCopoeia 还提供 pre-miRNA, miRNA inhibitor, promoter reporter 慢病毒包装服务。

对照慢病毒

GeneCopoeia 提供多种装载了eGFP, mCherry, Luciferase 等报告基因的阳性对照慢病毒颗粒或无报告基因的阴性对照慢病毒颗粒。

对照慢病毒颗粒价格低、滴度高、工期短，是随时进行梯度探索、预实验和对比实验的理想材料！

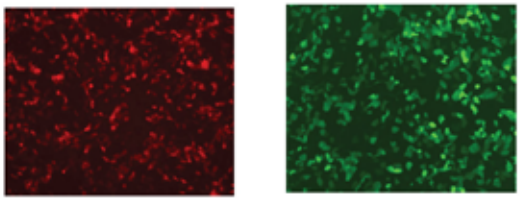
对照慢病毒	启动子：CMV / EF1a 筛选标记：Puromycin / Neomycin 报告基因：eGFP/ eYFP / eCFP / mCherry / Plum, Firefly / Renilla / Gaussia Luciferase , Firefly Luciferase + eGFP / mCherry, Renilla Luciferase + eGFP / mCherry, Firefly Luciferase + IRES / mCherry, Renilla Luciferase + IRES / mCherry.

慢病毒包装试剂盒

GeneCopoeia 的Lenti-Pac™ HIV 慢病毒包装试剂盒由优化的慢病毒包装质粒、eGFP 阳性对照质粒、EndoFectin™ 慢病毒专用转染试剂和TiterBoost™ 滴度增强剂组成。

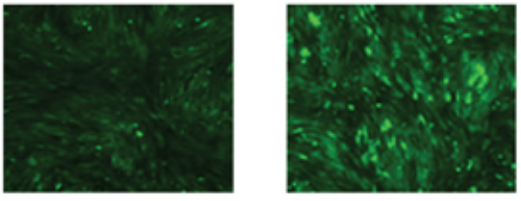
该系统与GeneCopoeia 的ORF、miRNA 及promoter 克隆配套使用可保证更高的滴度和表达水平。

实验示例



mCherry　　eGFP

图1. GeneCopoeia 慢病毒颗粒感染24孔板中H1299细胞，MOI=1. 左：LPP-MCHR-Lv105, 曝光时间为1s. 右: LPP-eGFP-Lv105, 曝光时间为 0.6s。



MOI = 10　　MOI = 30

图2. LPP-NEG-Lv201感染24孔板中NIH/3T3细胞。

发表的文章举例

Tsc1 (hamartin) confers neuroprotection against ischemia by inducing autophagy. M Papadakis, ***Nature Medicine.*** **lenti ORF (human TSC1 cat# CS-K2992-Lv201) & lenti-Pac packaging kit.**

Encoding and Transducing the Synaptic or Extrasynaptic Origin of NMDA Receptor Signals to the Nucleus. A Karpova, ***Cell.*** **shRNA lentivirus (vector HIVH1).**

GeneCopoeia, Inc.

Tel：　4006-020-200　020-32068595
Email：　sales@igenebio.com
Web：　www.genecopoeia.com
www.igenebio.com

章鱼：美在简单

章鱼，一种感觉灵敏、动作迅捷的动物。它有球状的套膜，无颈部，细小的头部直接与身体相连，八条腕足十分灵活。这些腕足向其身体外部呈对称性辐射，似乎可促使章鱼向各个方向位移。但是，既然有如此多的可能，那么它到底移向何处，又如何移动呢？还有，章鱼究竟怎样利用如此多的腕足来完成活动呢？此前，已有人对章鱼腕足的运动进行了研究，但对于它在运动过程中如何协调其腕足仍不清楚。最近，发表在《现代生物学》（*Current Biology*）的一项研究对此问题进行了探索，它是由以色列耶路撒冷希伯来大学（The Hebrew University of Jerusalem）的Guy Levy等人开展的，研究较为深入地了解了章鱼优雅的舞蹈。

作者将9条常见的章鱼——真蛸（*Octopus vulgaris*）置于一个水槽中。水槽底部透明，水深足以让章鱼自由呼吸和爬行，但游动就不太方便了。接着，研究小组在章鱼自如地环绕障碍物爬行，并好奇地探查水槽以及外面的观察者时，拍摄下它们的运动情况，然后分析其腕足的运动，从而确定章鱼是如何使用和协调腕足来进行移动的。

他们的研究表明，章鱼使用腕足运动的方式很像八条带吸盘的橡胶带：可压缩、固定和延伸。而令作者惊讶的是，他们发现：尽管

章鱼比较喜欢向其身体朝向的45度角移动，但最后却能向任何一个方向运行。因此，尽管章鱼偏好以对角线方向移动，但其实它们可向任何方向运行。同时，章鱼在爬行时，还喜欢使用特定的腕足和腕足对——具体的说，就是那些能够将它们送至想要去的对角线路径的腕足。同时，章鱼身体的朝向和爬行的方向是相互独立的。因此，作者提出，章鱼以最大化感官输入的方式，用身体的朝向来协调爬行的方向。

最令人惊异的是，章鱼不同于许多其它动物，它缺乏节奏感，所以在爬行时，其腕足无法以合拍的方式进行移动。也就是说，它们的运动是无规律的，任何一条腕足都能在任何时候向任何方向进行迅速的移动。

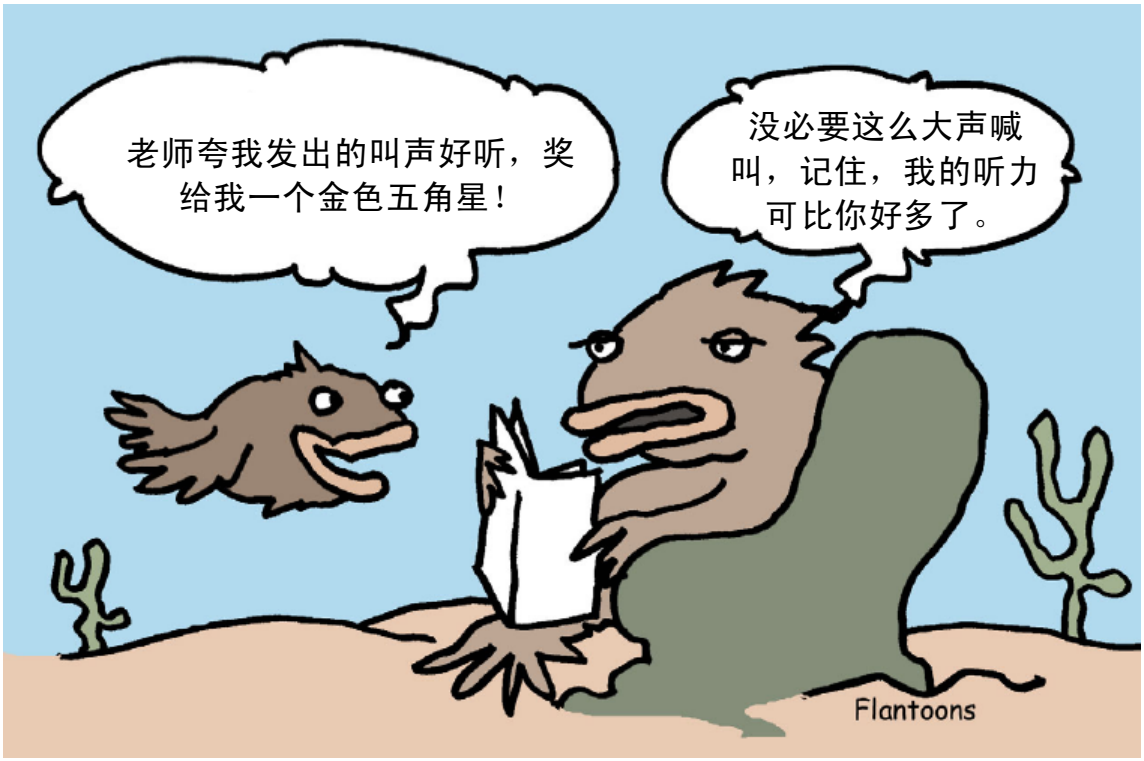
作者还发现，当章鱼的腕足成组配合（两条或者四条腕足）进行运动时，每条腕足实际上都会发挥同样的力量。比如说，章鱼不会让一条腕足产生比另一条多一倍的力量。因此，它们的运动方向是简化的，不需要决定每一条腕足要使用多少力度来向某个特定的方向移动，只需要决定应用哪些腕足即可。鉴于此，作者提出，章鱼的腕足做的是一种类似蠕动的简单运动，正因其很特别，其无规律的舞步才有一种简朴的美。作者还表示，这些特殊化的运动是软体动物章鱼对其周围环境产生特定适应的结果。

原文检索：

Levy, G., Flash, T. and Hochner, B. (2015). Arm coordination in octopus crawling involves unique motor control strategies. *Curr. Biol.* 25, 1195-1200.

文佳/编译

饶舌蟾鱼：听力随年龄一起成长



蟾鱼虽然没有扬名四海的魅力，但它们“健谈”的个性大大弥补了外表的不足：听！它们呱呱地叫，呼噜噜地咕哝，还有仿佛船上汽笛一样的清啸，连最小的幼鱼都积极加入到这场谈话之中。不过，如果没有同类去倾听其中的信息，那么这种交流就是毫无意义的。这件事情引起了来自中国澳门圣若瑟大学（University of Saint Joseph）的Raquel Vasconcelos的兴趣，他与来自葡萄牙里斯本大学（Universidade de Lisboa）的Andreia Ramos、Paulo Fonseca和Clara Amorim一同，试图了解这些吵吵嚷嚷的腋孔蟾鱼（*Halobatrachus didactylus*）的听力发育与其发声本领之间的匹配程度有多高。

首先，研究小组在葡萄牙塔古斯河与米拉河（Tagus and Mira river）的河口处下网捕捞这些爱交流的鱼儿，尺寸从娇小的幼鱼（长度1.7-2cm）到完全成熟的成鱼（25-35cm），然后记录下它们饶舌的谈话。接着，他们挑出三组年龄最大的鱼儿，将它们装船运到美国华盛顿大学（University of Washington）。在那儿，Vasconcelos、Peter Alderks和Joseph Sisneros为这些受试的鱼儿播放短爆破音，用来测量其耳内纤弱的毛细胞对这种音调的敏感性。

研究小组分析了鱼儿的全套发音，注意到当它们在抢夺食物时，会发出单个或者成串的呼噜声；而当单独呆在栖居处时，通常会有双音或者长串的呱呱声；若是遇到需要捍卫领土的时候，那么体型较大的幼鱼就会动用特殊的汽笛啸声。而且，研究小组意识到，随着鱼儿的年龄渐长，其发音也变得更为复杂。于是，

他们分析了蟾鱼对声音的敏感性，结果注意到，体型较大的幼鱼的听力敏感度比较小的幼鱼高三倍，达到与成鱼一致的水平。

因此，蟾鱼随着发声本领的增长，其听力敏感度也在逐渐提高。研究小组还表示，了解更多两者发育之间的相互作用，有助于理解动物交流的进化情况。

原文检索：

J Vasconcelos, R. O., Alderks, P. W., Ramos, A., Fonseca, P. J., Amorim, M. C. P. and Sisneros, J. A. (2015). Vocal differentiation parallels development of auditory saccular sensitivity in a highly soniferous fish. *J. Exp. Biol.* 218, 2864-2872.

文佳/编译

合办专题专刊
网站广告合作
邮件群发推广
请致电(020)32051255

www.LifeOmics.com